

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2016.

Ana Mikulin
668/BPI

**BIOLOŠKO UKLANJANJE
NUTRIJENATA – UČINAK
ORGANSKOG OPTEREĆENJA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za biološku obradu otpadnih voda na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Tibeke Landeka Dragičević.

Zahvaljujem se mentorici izv. prof. dr. sc. Tibeli Landeka Dragičević i asistentici dr. sc. Dijani Grgas na pomoći prilikom izrade diplomskog rada.

Zahvaljujem se obitelji na strpljenju i razumijevanju tijekom izrade ovog diplomskog rada, ali i na neograničenoj vjeri u mene tijekom cjelog školovanja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagreb

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za biološku obradu otpadnih voda

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

BIOLOŠKO UKLANJANJE NUTRIJENATA-UČINAK ORGANSKOG OPTEREĆENJA

Ana Mikulin, 668/BPI

Sažetak: U ovom radu istražen je učinak raspoloživog biorazgradivog organskog opterećenja (KPK) na uklanjanje nutrijenata, dušika i fosfata. Pokusi su provedeni pri aerobnim uvjetima, uz početnu koncentraciju $10,7\text{--}18,2 \text{ mg PO}_4^{3-}\text{-P L}^{-1}$ i $48\pm 1,3 \text{ mg NH}_4^+\text{-N L}^{-1}$ i pri omjeru C/N 1, 3, 4, 5, 6 i 7. Kao izvor ugljika korišten je natrijev acetat. Rezultati pokazuju da aktivni mulj ima aktivnost za istovremeno uklanjanje N i fosfata. S povećanjem omjera C/N proporcionalno je veće uklanjanje N, koje pri C/N 1, 3, 4, 5, 6 i 7 iznosi 14,3%, 33,3%, 41,9%, 35,4%, 77,6% i 89,7%. Povećanjem omjera C/N povećava se uklanjanje ukupnog dušika, i pri C/N 1 iznosi 14,3%, a pri C/N 7 iznosi 89,7%. Najveće uklanjanje fosfata od 60,7% je postignuto pri omjeru C/N 4. Profili pH i otopljenog kisika neizravni su pokazatelji mikrobnih reakcija tijekom uklanjanja N i P.

Ključne riječi: aerobni uvjeti, dušik, fosfor

Rad sadrži: 45 stranica, 14 slika, 0 tablica, 59 literaturnih navoda, 1 prilog

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: izv. prof. dr. sc. Tibela Landeka Dragičević

Pomoć pri izradi: dr. sc. Dijana Grgas

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof. dr. sc. Marin Matošić
2. Izv. prof. dr. sc. Tibela Landeka Dragičević
3. Izv. prof. dr. sc. Ksenija Markov
4. Doc. dr. sc. Josip Ćurko

Datum obrane: 30. rujna 2016

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Department of Food Engineering

Laboratory for the Biological Waste Water Treatment

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Biotechnology

BIOLOGICAL NUTRIENT REMOVAL – EFFECT OF ORGANIC LOAD

Ana Mikulin, 668/ BPI

Abstract: The effect of organic load (biodegradable COD) on biological nutrient removal (nitrogen and phosphate) was investigated. The experiments were conducted at aerobic conditions, at an initial concentration of $10.7\text{--}18.2\text{ mg PO}_4^{3-}\text{-P L}^{-1}$ i $48\pm 1.3\text{ mg NH}_4^+\text{-N L}^{-1}$ at a C/N ratio of 1, 3, 4, 5, 6 and 7. Sodium acetate was used as a carbon source. The results show that activated sludge has the ability to simultaneously remove nitrogen and phosphate. By increasing the C/N ratio, nitrogen removal increased as well. The nitrogen removal at C/N 1, 3, 4, 5, 6 and 7 was 14.3%, 33.3%, 41.9%, 35.4%, 77.6% i 89.7%. Also, an increased C/N ratio resulted in an increased total nitrogen removal, and at a C/N 1 and C/N 7, the total nitrogen removal was 14.3% and 89.7%, respectively. The biggest phosphate removal of 60.7 % was achieved at C/N 4. DO and pH profiles are indirect indicators of microbial reactions during N and P removal.

Keywords: aerobic conditions, nitrogen, phosphorus

Thesis contains: 45 pages, 14 figures, 0 table, 59 references, 1 supplements

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: PhD Tibela Landeka Dragičević, Associate Professor

Technical support and assistance: Dijana Grgas, PhD.

Reviewers:

1. PhD Marin Matošić, Full Professor
2. PhD Tibela Landeka Dragičević, Associate Professor
3. PhD Ksenija Markov, Associate Professor
4. PhD Josip Ćurko, Assistant Professor

Thesis defended: September 30th, 2016

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Uklanjanje dušika	2
2.2. Uklanjanje fosfora	3
2.3. Mehanizam EBPR procesa	4
2.4. Nitrifikanti, denitrifikanti i mikroorganizmi prisutni u EBPR sustavu	6
2.4.1. Nitrificirajuće i denitrificirajuće bakterije	6
2.4.2. Mikroorganizmi prisutni u EBPR sustavu	7
2.4.2.1. PAO _s	7
2.4.2.2. GAO _s	8
2.4.2.3. DPAO _s	8
2.5. Čimbenici procesa nitrifikacije, denitrifikacije i uklanjanja fosfora	9
2.5.1. Temperatura	9
2.5.2. pH	9
2.5.3. Izvor ugljika	10
2.5.4. Kisik (aeracija)	11
2.5.5. Nitriti/FNA	11
2.5.6. Nitrati	12
2.5.7. Ioni	12
2.6. Izvedbe sustava za nitrifikaciju i denitrifikaciju uz uklanjanje fosfora	12
2.6.1. Nitrifikacija s naknadnom/prethodnom denitrifikacijom	13
2.6.2. Bardenpho sustav	13
2.6.3. PhoStrip proces	14
2.6.4. Proces biološko-kemijskog uklanjanja dušika i fosfora	15
2.7. Granulirani aerobni mulj	15
3. EKSPERIMENTALNI DIO	17
3.1. Materijali	17
3.1.1. Aktivni mulj	17
3.1.2. Priređena otpadna voda	17
3.1.3. Aparatura za aerobno uklanjanje N i P	17
3.2. Metode	18
3.2.1. Fizikalno-kemijske analitičke metode	18
3.2.2. Određivanje koncentracije fosfata	18
3.2.3. Određivanje koncentracije nitrata	18

3.2.4.	Određivanje koncentracije nitrita.....	19
3.2.5.	Određivanje koncentracije amonijaka.....	19
3.2.6.	Određivanje kemijske potrošnje kisika (KPK).....	19
3.2.7.	Određivanje koncentracije ukupnog dušika.....	20
3.2.8.	Određivanje koncentracije otopljenog kisika.....	21
3.2.9.	Određivanje temperature.....	21
3.2.10.	Određivanje pH vrijednosti.....	21
4.	REZULTATI I RASPRAVA	22
5.	ZAKLJUČCI	38
6.	LITERATURA	39
7.	PRILOG	

1. UVOD

Fosfor i dušik smatraju se glavnim uzročnicima eutrofikacije koja se opisuje kao pretjerani rast algi, čime se smanjuje koncentracija otopljenog kisika u vodenim sustavima. Nedostatak dovoljno otopljenog kisika uzrokuje smrt biljnog i životinjskog svijeta (Bal Krishna i sur., 2016; Seviour i sur., 2003).

U vodene sustave fosfor i dušik (P i N) dopijevaju antropogenim djelovanjem, koriste se za gnojidbu, ali i u kućanstvu te se tijekom primjene višak ispire i dopijeva u vodene tokove (Wentzel i sur., 2008).

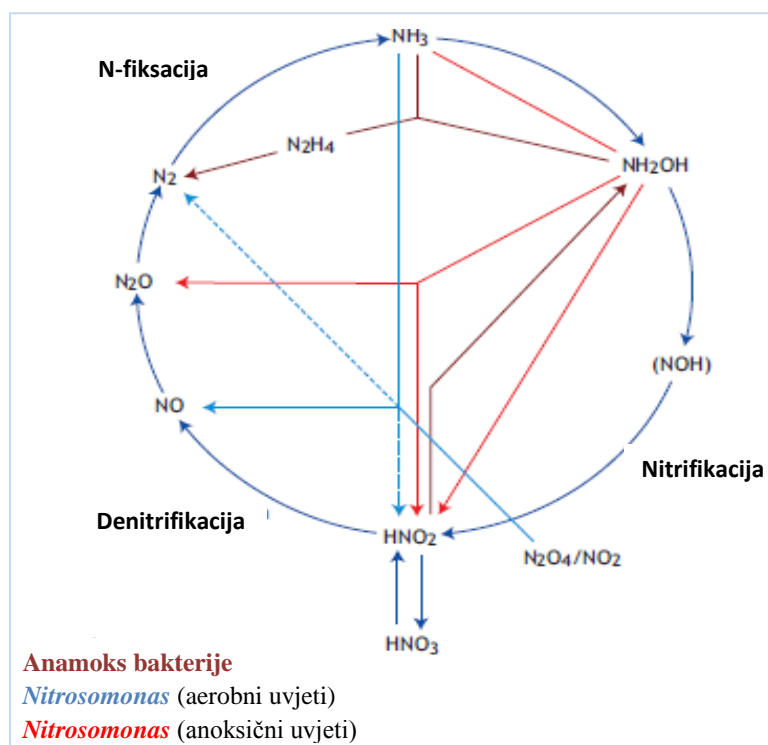
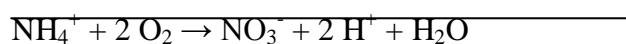
Biološko uklanjanje nutrijenata smatra se ekonomski najisplativijim i ekološki najodrživijim načinom asimilacije dušika i fosfora iz otpadnih voda (Metcalf i Eddy, 2003). Provodi se pomoću fosfor akumulirajućih organizama (PAO_s, eng. *Phosphorus Accumulating Organisms*) i denitrificirajućih organizama koji zahtijevaju izvore ugljika (KPK) (Naessens i sur., 2012; Gebremariam i sur., 2011; Hu i sur., 2011). Često je izvor ugljika u otpadnim vodama limitiran te se teško zadovoljavaju potrebe za simultano uklanjanje dušika i fosfata (Xu i sur., 2011). Problem limitacije izvorom ugljika riješen je primjenom sustava za napredno biološko uklanjanje fosfora (EBPR, eng. *Enhanced Biological Phosphorus Removal*). U EBPR mulju se uz PAO_s nalaze i denitrificirajući fosfor akumulirajući organizmi (DPAO_s, eng. *Denitrifying Phosphorus Accumulating Organisms*). U anoksičnim uvjetima, DPAO_s umjesto kisika koriste nitrate kao akceptor elektrone za dobivanje energije i akumulaciju P i tako istovremeno uklanjaju nitrate i fosfate iz otpadnih voda (Jena i sur., 2016).

Stjecanju spoznanja o biološkom uklanjanju nutrijenata doprinosi i ovaj rada u kojem je postavljen cilj definirati učinak raspoloživih organskih sastojaka na biološke procese uklanjanja N i P. U tu svrhu istražit će se uklanjanje N i P iz priređene otpadne vode pri aerobnim uvjetima u kojima je izvor organskih sastojaka natrijev acetat dodan u omjeru C/N 1, 3, 4, 5, 6 i 7 (prema početnoj koncentraciji $\text{NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$), za početne koncentracije 10,7-18,2 $\text{mg PO}_4^{3-} \text{ L}^{-1}$ ($14,5 \pm 3,8 \text{ PO}_4^{3-} \text{ L}^{-1}$) i $48 \pm 1,3 \text{ mg NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Uklanjanje dušika

Biološke metode uklanjanja dušika uključuju aerobnu nitrifikaciju u kojoj se amonijak oksidira preko nitrita do nitrata, jednačbe [1] i [2], i anoksičnu denitrifikaciju, redukciju nitrata do plinovitog dušika, jednačba [3] (Coma i sur., 2012; Metcalf i Eddy, 2003). Ciklus kruženja dušika prikazan je slikom 1.



Slika 1. Ciklus kruženja dušika, prilagođeno iz Henze i sur., (2008).

Nitrifikaciju provode autotrofni i heterotrofni mikroorganizmi, heterotrofni potrebe za ugljikom i energijom zadovoljavaju iz istog organskog supstrata, dok autotrofni mikroorganizmi koriste CO_2 kao izvor ugljika, a energiju dobivaju oksidacijom amonijaka u nitrite i nitrita u nitrate (Henze i sur., 2008).

Mikroorganizmi koji provode oksidaciju amonijaka mogu provoditi i druge procese, u uvjetima limitacije kisikom *Nitrosomonas* može prevesti hidroksilamine i nitrite u plin didušikov oksid, procesom koji se naziva deamonifikacija (Bock i sur., 1995). Pri anoksičnim uvjetima u prisutnosti plina NO_2 neki organizmi mogu prevesti amonijak u NO (Schmidt i sur., 2002). Obje konverzije dovode do uklanjanja amonijaka, ali pri tome nastaju toksični i staklenički plinovi. U anaerobnim uvjetima Anamoks bakterije oksidiraju amonijak do N_2 uz nitrite kao elektron akceptore (Mulder i sur., 1995).

Za provedbu oksidacije amonijaka u nitrite potrebno je $3,43 \text{ mg O}_2/\text{mgN}$, a za oksidaciju nitrita u nitrate $1,1 \text{ mg O}_2/\text{mg N}$ (Henze i sur., 2008).

Uvođenjem neaeriranih zona u sustave u kojima se odvija nitrifikacija uklanjaju se nastali nitrati, raste pH vrijednost i reduciraju se potrebe na kisiku. Za denitrifikaciju 1 mg NO_3^- u N_2 plin u anoksičnoj zoni potrebno je $8,6 \text{ mg KPK}$ (Henze i sur., 2008).

2.2. Uklanjanje fosfora

Fosfor se u otpadnim vodama nalazi u otopljenom obliku, a može se uklanjati fizikalno-kemijskim i biološkim metodama.

Samo 15 % od ukupnog fosfora uklanja se primarnom sedimentacijom, bez dodatka metalnih soli. Tradicionalne taložne metode temelje se na prijenosu otopljenog fosfora u čvrstu fazu i separacijom – fizikalno-kemijske metode (Rashed i sur., 2014). Većinom se za kemijsko taloženje koriste soli željeza, aluminija i kalcija. Ovim metodama P se učinkovito uklanja ali ekonomski nisu isplative, kemikalije su skupe te nastaju velike količine kemijskog mulja (Bal Krishna i sur., 2016; Seviour i sur., 2003).

Biološke metode uklanjanja fosfora su jeftinijih troškova izvedbe, učinkovite su i nastaje manja količina mulja. Biološki postupci poznati su pod nazivom napredno biološko izdvajanje fosfora (EBPR) (Liu i sur., 2007). EBPR procesom može se ukloniti oko 85% fosfora iz otpadnih voda domaćinstava, koncentracija $<0,1 \text{ mg P L}^{-1}$ (Gebremariam i sur., 2011).

EBPR se postiže recirkulacijom aktivnog mulja kroz naizmjenične aerobne i anaerobne uvjete rasta, a ujedno se i postiže selekcija organizama koji provode taj proces (Oehmen i sur.,

2007). U EBPR mulju u najvećem postotku prisutni su fosfor akumulirajući organizmi (PAO_s, eng. *Phosphate Accumulating Organisms*), slijede denitrificirajući fosfor akumulirajući organizmi (DPAO_s, eng. *Denitrifying Phosphorus Accumulating Organisms*). PAO_s su sposobni akumulirati P u koncentracijama većim od potrebnim za rast. Organizmi prisutni u „običnom“ aktivnom mulju mogu akumulirati približno 2% fosfora u suhoj biomasi EBPR organizmi mogu akumulirati 4-8 % fosfata (Gebremariam i sur., 2011).

Brojne su poteškoće vezane uz vođenje EBPR procesa, poput: manja stabilnost vođenja procesa, smanjeno uklanjanje N i P, ili potpuni prestanak biološkog uklanjanja fosfora (Stephens i sur., 2004; Thomas i sur., 2003).

Na EBPR proces nepovoljni učinak imaju čimbenici poput primjerice velika količina nitrata u anaerobnom reaktoru, zasićenje supstratom, a negativan učinak ima i mikrobiološko nadmetanje PAO_s i glikogen akumulirajućih organizama (GAO_s, eng. *Glycogen Accumulating Organisms*). GAO_s se smatraju nepoželjnim mikroorganizmima u sustavima za biološku obradu otpadnih voda jer se natječu s PAO_s za hlapljive masne kiseline (VFA, eng. *Volatile Fatty Acids*) u anaerobnim uvjetima a kako GAO_s ne uklanjaju fosfor povećavaju troškove procesa te se nastoji umanjiti njihov rast u EBPR sustavima (Gu i sur., 2005; Thomas i sur., 2003).

2.3. Mehanizam EBPR procesa

EBPR sustavi mogu biti različitih konfiguracija (Jena i sur., 2016), te tako mulj može prolaziti kroz:

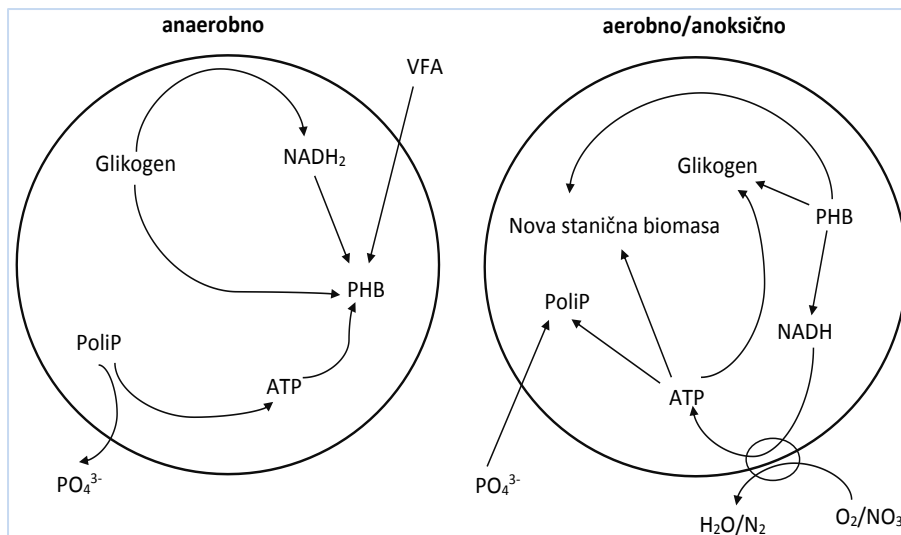
- anaerobno-aerobno-anoksične uvjete (AOA, eng. *anaerobic-oxic-anoxic*),
- anaerobno-anoksično-aerobne uvjete (AAO, eng. *anaerobic-anoxic-oxic*),
- aerobno-anoksične uvjete rasta (OA, eng. *oxic-anoxic*)

Pri aerobno-anoksičnim uvjetima nitrat ne utječe na akumulaciju fosfora. Utvrđeno je da unos fosfora nije inhibiran nitratima u anoksičnim uvjetima, zamijećeno je iscrpljivanje nitrata, rast stanica, skladištenje fosfata u obliku polifosfata i sinteza glikogena (Jena i sur., 2016; Liu i Dong, 2011).

Napredno biološko uklanjanje fosfora se široko primjenjuje u brojnim postrojenjima za obradu otpadnih voda kao ekonomična i održiva metoda za uklanjanje fosfora (Liu i sur., 2007). Ukupno uklanjanje fosfora se postiže uklanjanjem viška aktivnog mulja koji je bogat

polifosfatima (Zhou i sur., 2008). Otpadni mulj iz EBPR procesa sadrži velike količine P, i može predstavljati održiv izvor sirovog materijala za industriju gnojiva i za obnovu P.

Mehanizam EBPR procesa prikazan je slikom 2.



Slika2. Shematski prikaz metabolizma PAOs u anaerobnim i aerobnim uvjetima

U anaerobnim uvjetima, PAOs akumuliraju hlapljive masne kiseline prisutne u hranjivom mediju od kojih su najzastupljenije acetat, a potom slijede propionat, butirat, valerat i ostale soli VFA u malim koncentracijama. U otpadnim vodama prisutne su i ostale organske molekule poput aminokiselina i šećera koje mogu metabolizirati i PAOs i GAOs (Oehmen i sur., 2007). PAOs pohranjuju VFA unutar stanice kao polihidroksialkanoate (PHA, eng. *polihydroxyalkanoate*) čiji sastav ovisi o vrsti ugljika. Asimilacijom acetata sintetizira se polihidroksibutirat (PHB, eng. *polihydroxybutirate*), a asimilacijom propionata nastaje polihidroksivalerat (PHV, eng. *polihydroxyvalerate*) (Seviour i sur., 2003). Energija za uzimanje i skladištenje VFA osigurava se raskidanjem fosfodieterskih veza polifosfata, u obliku ATP, te glikolizom glikogena koji osigurava NAD(P)H i dodatnu energiju za sintezu PHA. Razgradnja polifosfata rezultira otpuštanjem ortofosfata iz stanice u tekući medij. Učinkovitost uzimanja i skladištenja VFA anaerobne faze daje poli-P organizmima selektivnu prednost nad drugim članovima zajednice (Wang i sur., 2009).

Sintetizirani PHA u anaerobnoj fazi razgrađuje se u aerobnoj fazi do acetil-CoA i propionil-CoA tj. u forme koje preko okasloacetata ulaze u ciklus trikarbonskih kiselina. Acetil-CoA i propionil-CoA služe kao izvor ugljika i energije za rast biomase, dok se dio ATP-a koristi za

unos fosfata, te popunjavanje zaliha glikogena (Oehmen i sur., 2007). Velike količine akumuliranog PHA (PHB) osiguravaju energiju za unos P u aerobnim uvjetima (Wang i sur., 2009).

U aerobnoj/anoksičnoj fazi, PAOs koriste kisik/nitrat kao elektron akceptor te PHA za dobivanje energije za stanični rast, sintezu glikogena i unos P (Oehmen i sur., 2005). Unutarstanično pohranjeni P u obliku poliP se odvodi iz sustava sa otpadnim muljem. Alternativno, kao elektron akceptori se mogu koristiti nitrati ili nitriti (tj. anoksični uvjeti) umjesto kisika, što čini prednost jer se i N i P uklanjaju u istom procesu (Kuba i sur., 1994).

Fosfor se može lako ukloniti iz otpadne vode uklanjanjem mulja bogatog fosforom (Oehmen i sur., 2007) budući je količina izlučenog fosfata za vrijeme anaerobne faze manja od količine fosfata koja je unesena unutarstanično za vrijeme aerobne ili denitrificirajuće faze.

Pronađeno je da je za biološko uklanjanje P acetat esencijalan za formiranje PHB u anaerobnim uvjetima, što omogućuje kompetitivnu prednost za PAOs, budući da PAOs preferiraju niskomolekularne supstrate koji su produkt fermentacije, preferirani supstrat ne bi bio dostupan bez anaerobne zone koja omogućuje fermentaciju KPK iz influenta do acetata. Zbog sposobnosti pohrane polifosfata u aerobnoj/anoksičnoj fazi, PAOs imaju dostupnu energiju za asimilaciju acetata u anaerobnoj fazi. Druge aerobne heterotrofne bakterije nemaju takav mehanizam za unos acetata, i one gladuju dok PAOs asimiliraju KPK u anaerobnoj fazi (Metcalf i Eddy, 2003).

Glavna razlika između aerobnog i anoksičnog unosa fosfata je da PAOs za formiranje ATP u anoksičnim uvjetima koriste nitrat. Ostatak metabolizma PAOs u aerobnim i anoksičnim uvjetima je isti. No, u anoksičnim uvjetima se formira oko 40% manje ATP po količini NADH_2 nego u aerobnim uvjetima. Nizak omjer ATP/ NADH_2 u konačnici znači manju proizvodnju biomase u anoksičnim uvjetima.

2.4. Nitrifikanti, denitrifikanti i mikroorganizmi prisutni u EBPR sustavu

2.4.1. Nitrificirajuće i denitrificirajuće bakterije

Nitrifikacija se može provoditi pomoću autotrofnih, heterotrofnih i miksotrofnih nitrificirajućih bakterija. Jedina razlika među vrstama je u načinu dobivanja energije za rast i razmnožavanje. Oksidaciju amonijaka do nitrita provode *Nitrosomonas* vrste koje pripadaju rodovima *Nitrosomonas* sp., *Nitrosococcus* sp., *Nitrospira* sp., *Nitrosolobus* sp. i

Nitrosovibrio sp. Oksidaciju nitrita u nitrate provode *Nitrobacter* vrste koje pripadaju rodovima *Nitrobacter* sp., *Nitrococcus* sp., *Nitrospina* sp. i *Nitrospira* sp. (Metcalf i Eddy, 2003).

Denitrificirajuće bakterije provode redukciju nitrata ili nitrita do plinovitog oksida (NO ili N₂O) i konačno do plinovitog dušika. Denitrifikaciju provode fakultativno anaerobne ili anaerobne bakterije iz rodova *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Moraxella*, *Thiobacillus*, *Klebsiela* i dr. (Metcalf i Eddy, 2003).

2.4.2. Mikroorganizmi prisutni u EBPR sustavu

EBPR mulj uključuje veliki broj mikrobnih vrsta koje su definirane sastavom supstrata, brzinom dotoka supstrata, anaerobno-aerobnim kontaktnim vremenom, temperaturom, pH i brojnim drugim faktorima. Sličan je konvencionalnom aktivnom mulju s različitim vrstama virusa, bakterija, protozoa, alga, funga i metazoa (Gebremariam i sur., 2011). U brojnim istraživanjima uz pomoć genetičkih metoda izolirane su Gram-negativne bakterije: *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Enterobacter*, *Lamprospedia*, *Moraxella*, *Pseudomonas* i Gram-pozitivne bakterije: *Bacillus*, *Micrococcus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* (Gebremariam i sur., 2011; Hrenović, 2011; Seviour i sur., 2003).

2.4.2.1. PAOs

Vrste roda *Acinetobacter* smatraju se biokemijskim modelima EBPR procesa (Gebremariam i sur., 2011; Hrenović, 2011). Istaknuto je (Gebremariam i sur., 2011) da polifosfat akumulirajuće *Accumulibacter* vrste predstavljaju 20% ukupne bakterijske populacije i imaju više od 70% fosfor akumulirajuće aktivnosti. U drugim istraživanjima je istaknuto da u ukupnoj populaciji mikrobne zajednice *Accumulibacter* sačinjavaju 7-12% (4 australijska postrojenja) (Saunders i sur., 2003), 5 do 22% (3 njemačka postrojenja) (Kong i sur., 2004), 7-17% (4 japanska postrojenja) (Chua i sur., 2006), 6-16% (7 nizozemskih postrojenja) (Lopez-Vazquez i sur., 2008) i 40-70 % (5 postrojenja Sjedinjenih Američkih Država) (He i sur., 2008). *Acinetobacter* uključuju vrste: *A. baumannii*, *A. baylyi*, *A. bouvetii*, *A. calcoaceticus*, *A. gernerii*, *A. jonsonii*, *A. junii*, *A. lwoffii*, *A. tandoii*, *A. tjernbergiae*, *A. townneri* (Hrenović, 2011). Zbog sposobnosti akumuliranja polifosfata *A. junii* služi kao modelni organizam za proučavanje metaboličke energije, enzima koji sudjeluju u metabolizmu polifosfata i membranskog transporta u EBPR organizmima (Gebremariam i sur., 2011).

Najveći broj bakterija iz reda *Betaproteobacteria*, a manju ali svejedno značajnu količinu bakterija iz reda *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria* i *Gammaproteobacteria* su kombinacijom FISH analize i kemijskog označavanja u aktivnom mulju detektirali Wong i sur. (2005). Značajan je i broj fosfat akumulirajućih vrsta iz roda *Tetrasphaera* koji uključuje *T. japponica*, *T. australiensis*, *T. elongate*, *T. vanveenii*, *T. jenkinsii*, *T. veronensis* (Gebremariam i sur., 2011). Tehnikama molekularne biologije kao što su FISH, kloniranje i direktno sekvencioniranje ribosomske RNA, određena je prisutnost bakterija iz roda *Rhodocyclus* u sustavu s EBPR svojstvima u značajnoj količini naspram ostalih bakterija prisutnih u aktivnom mulju te je pokazano da *Rhodocyclus* spp. posjeduje ključne osobine metabolizma PAO_s (Hesselmann i sur. 1999; Bond i sur. 1995).

2.4.2.2. GAOs

Oehmen i sur. (2007) naglašavaju važnost glikogen akumulirajućih organizama (GAO_s) (eng. *Glycogen Accumulating Organisms*). GAO_s su definirani kao organizmi koji u aerobnim uvjetima nakupljaju glikogen, a u anaerobnim uvjetima ga troše kao primarni izvor energije i za akumuliranje PHA. Ove bakterije rastu u aktivnom mulju u istim uvjetima kao PAO_s, konkuriraju im za supstrat, ali nemaju sposobnost akumulacije poli-P. Na taj način smanjuje se broj PAO_s i učinkovitost EBPR sustava (Oehmen i sur., 2005).

Istraživanjem EBPR muljeva lošijih karakteritika, Crocetti i sur. (2002) su dizajnirali nove FISH probe kojima su detektirane bakterije reda *Gammaproteobacteria*. Identifikacijom GAO_s fenotipa ti su organizmi nazvani *Candidatus Competibacter phosphatis*.

Povezanost između prisutnosti velikih nakupina *Competibacter* u mulju i malih količina otpuštenog fosfora u odnosu na potrošnju VFA potvrđuje da *Competibacter* konkurira PAO_s u anaerobnom asimiliranju VFA u EBPR procesima (Gu i sur., 2005; Saunders i sur., 2003).

2.4.2.3. DPAOs

U aktivnom mulju mogu biti prisutne i P-akumulirajuće denitrificirajuće bakterije (DPAO_s). U anoksičnim uvjetima DPAO_s umjesto kisika koriste nitrate kao akceptor elektrone za dobivanje energije i akumulaciju poli-P i tako istovremeno uklanjaju nitrate i fosfate iz otpadnih voda (Jena i sur., 2016; Wang i sur., 2012; Zhou i sur., 2012). Simultanom denitrifikacijom, nitrifikacijom i uklanjanjem fosfora, DPAO_s troše manje ugljika, proizvode 20-30% manje biomase, što rezultira manjim količinama nastalog mulja, koriste potencijalno inhibirajuće nitrate/nitrite, i smanjuju potrebu za aeracijom (Guo i sur., 2011; Kuba i sur., 1994).

Iz aktivnog mulja anaerobno/anoksičnog sustava s EBPR svojstvima izolirani su rodovi bakterija koji mogu koristiti nitrat kao terminalni akceptor elektrona i akumulirati P: *Aeromonas*, *Agrobacterium*, *Aquaspirillum*, *Corynebacterium*, *Haemophilus*, *Ochrobactrum*, *Pseudomonas*, *Shewanella* i *Xantomonas* (Merzouki i sur., 1999).

2.5. Čimbenici procesa nitrifikacije, denitrifikacije i uklanjanja fosfora

Brojni čimbenici imaju učinka na učinkovitost vođenja EBPR proces, poput: prisutnost nitrita/nitrata u anaerobnoj fazi (Kuba i sur., 1994), prevelika koncentracija kalcija i magnezija, prevelika aeracija, kompeticija između PAO_s i GAO_s. Međuodnose PAO_s i GAO_s definiraju koncentracija supstrata u pritoku, prisutnost željeza, razina otopljenog kisika i starost mulja, a tri najznačajnija faktora su temperatura, pH i izvor ugljika (Wang i sur., 2009; Oehmen i sur., 2005).

2.5.1. Temperatura

Učinkovitost EBPR sustava je proporcionalna povećanju temperature. Pri temperaturi ispod 20 °C reducira se ili inhibira unos fosfata, te je predložena optimalna temperatura 24-37 °C. Neka istraživanja pokazala su da su EBPR sustavi stabilni i učinkoviti u rasponu temperature 5-30 °C. PAO_s preferiraju niže temperature (5 °C) i dokazana je bolja učinkovitost uklanjanja P, a pokazalo se da GAO_s nadvladava PAO_s pri >20 °C (Gebremariam i sur., 2011; Oehmen i sur., 2005).

Optimalna temperatura za odvijanje nitrifikacije je između 25 i 30 °C (Metcalf i Eddy, 2003), što sugerira da se oksidacija amonijaka i uklanjanje fosfata može odvijati istovremeno.

2.5.2. pH

Proces odvijanja nitrifikacije inhibira se pri pH>8,5 (raste koncentracija OH⁻) ili pri pH< 7 (raste koncentracija H⁺). Optimalna pH vrijednosti za proces nitrifikacije je između pH 7 i pH 8,5 (Henze i sur., 2008). Metcalf i Eddy (2003) navode da je optimalna pH vrijednost za proces nitrifikacije 7,2. U sustavima s uključenom denitrifikacijom pH nema značajnog utjecaja na odvijanje nitrifikacije. U anoksičnoj zoni limitirano je smanjenje pH jer se troše nitrati i nitriti dobiveni nitrifikacijom. Denitrifikacijom se može kontrolirati pH vrijednost nitrificirajućih/denitrificirajućih sustava (Henze i sur., 2008).

U brojnim istraživanjima zamijetilo se da povećanjem pH sa 7,0 na pH 8,0 raste broj PAO_s (*Accumulibacter*), a smanjuje se koncentracija GAO_s (Gebremariam i sur., 2011; Oehmen i

sur. 2007; Oehmen i sur. 2005). U alkalnom okruženju organizmi trebaju više energije za unos supstrata, a koja se osigurava hidrolizom poli-P (Jena i sur., 2016).

Zhang i sur. (2005) uočili su u EBPR sustavima promjenu u mikrobnom sastavu i gubitak sposobnosti uklanjanja fosfora kod $\text{pH} < 7,0$ pri $\text{pH} 6,5$. Testovima provedenim u aerobnim uvjetima pokazalo se da pri $\text{pH} < 6,5$ smanjuje se unos fosfata, oksidacija PHA i rast biomase što ukazuje da viši pH pogoduje rastu PAO_s (Oehmen i sur., 2007).

U anaerobnim uvjetima kod viših pH vrijednosti dolazi do bržeg otpuštanja fosfata u okolni medij (Jena i sur., 2016). Brzina anaerobnog otpuštanja fosfora u odnosu na unos acetata varira između 0,25 i 0,75 P-mol/C-mol, dok pH vrijednost raste od 5,5 do 8,5. Brzina otpuštanja fosfata povećava se pri višim pH vrijednostima (Oehmen i sur., 2007).

Kod GAO_s s povećanjem pH vrijednosti smanjuje se unos acetata. Više pH vrijednosti negativno utječu na sposobnost GAO_s za korištenje acetata jer GAO_s nemaju rezerve polifosfata kao PAO_s (Oehmen i sur., 2007).

Brojnim istraživanjima potvrđena je ovisnost pH o uspješnosti odvijanja EBPR procesa. Vrijednost $\text{pH} > 7,0$ uglavnom pogoduje PAO_s populaciji i olakšava inhibiciju nepoželjne GAO_s kulture, čija prisutnost otežava odvijanje EBPR. Kao granica povišenja pH navodi se $\text{pH} 8,0$ nakon čega nastupa otežano uklanjanje fosfora i nakupljanje VFA i fosfata (Oehmen i sur., 2005; Schuler i Jenkins, 2002).

2.5.3. Izvor ugljika

Za EBPR sustave osiguravaju se veće koncentracije KPK (kemijska potrošnja kisika) u pritoku, nego u konvencionalnim postrojenjima jer EBPR organizmi skladište produkte koji zahtijevaju zasebne izvore ugljika za sintezu. Preporuča se da omjer VFA i fosfora odnosno KPK i fosfora bude 14 odnosno 16 u dovodnim vodama kako bi se postigla niska koncentracija fosfora u obrađenoj vodi. Neki autori navode da visoki omjeri KPK i fosfora mogu limitirati unos fosfora te potaknuti proliferaciju GAO_s . Kako bi se izbalansirali ovi uvjeti predloženo je da acetat-KPK/fosfat bude približno 10 kako bi se postiglo visoko uklanjanje fosfora, a izbjegnule limitacije ugljikom i fosforom.

Pokazalo se da i tip izvora ugljika utječe na uspješno provođenje EBPR. Dodatak propionata ili acetata utječe na proliferaciju GAO_s (Barat i sur., 2008; Oehmen i sur., 2005). PAO brzo metaboliziraju i propionat i acetat, dok GAO_s moraju prilagoditi metabolizam na ove izvore ugljika. Glukoza je još jedan izvor ugljika koji utječe na kompeticiju među PAO_s i GAO_s pa tako može povećati proliferaciju GAO_s i omesti uklanjanje fosfora. Druga istraživanja pak pokazuju da glukoza inducira uklanjanje fosfora ako je jedini izvor ugljika u sustavu (Oehmen

i sur., 2005). Gebremariam i sur. (2012) su nakon niza pokusa s različitim omjerom acetata i glukoze zaključili da do limitacije unosa fosfora i denitrifikacije dolazi kod 100%-tnog udjela glukoze u supstratu. Dodatkom jednakih količina glukoze i acetata efikasnije je uklanjanje fosfora i sustav je stabilniji u odnosu kad je samo acetat izvor ugljika (Gebremariam i sur., 2011).

2.5.4. Kisik (aeracija)

Za odvijanje nitrifikacije dovoljno je $2 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$, iako se navodi koncentracija otopljenog kisika između $3 \text{ i } 7 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ (Metcalf i Eddy, 2003). Yuan i Gao (2010) u eksperimentima s granuliranim muljem navode da se pri $1,0 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ uklanja najviše dušika, 94,88 %. Henze i sur. (2008) navode da visoke koncentracije otopljenog kisika, više od $33 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ ne utječu na odvijanje nitrifikacije. Međutim, niske koncentracije reduciraju odvijanje nitrifikacije.

Koncentracija otopljenog kisika (DO eng., *Dissolved oxygen*)) utječe na kompeticiju PAO_s – GAO_s. Pri koncentraciji otopljenog kisika $2,5\text{-}3,0 \text{ mg L}^{-1}$ raste broj PAO_s vrsta. Pri niskim vrijednostima koncentracije otopljenog kisika uočava se obilje *Accumulibacter*, dok se smanjuje broj vrsta iz *Competibacter* (GAO_s) (Oehmen i sur., 2007).

Guo i sur. (2011) navode da je za uspješnu istovremenu nitrifikaciju i denitrifikaciju uz uklanjanje P nužna niska koncentracija otopljenog kisika, $0,1\text{-}0,6 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ u prva dva sata vođenja procesa.

Pokazalo se da aerobni uvjeti uzrokuju stresno stanje za DPAO_s. U dugotrajnim aerobnim uvjetima trend unosa fosfata se inhibira te dolazi do otpuštanja fosfata u medij. Jena i sur. (2016) navode da je razlog tome limitacija nitratom jer dominantna mikroflora ne može koristiti kisik kao akceptor elektrona pa zato raskida rezerve polifosfata kako bi osigurala energiju za održavanje.

2.5.5. Nitriti/FNA

Nitriti su međuprodukti nitrifikacije/denitrifikacije te je moguće njihovo nakupljanje u reaktoru. Uočeno je da je aerobno-anoksično uklanjanje fosfora inhibirano prisutnošću dušikaste kiseline (FNA, eng. *Free Nitrous Acid*) tj. protoniranog oblika nitrita (Pijuan i sur., 2010; Zhou i sur., 2008). Akumulacijom nitrita u anoksičnoj fazi povećava se populacija *Competibacter* što navodi da to može biti faktor koji pospješuje brži rast GAO_s nad PAO_s jer je brzina rasta PAO_s inhibirana u prisutnosti nitrita (Oehmen i sur., 2007).

2.5.6. Nitrati

Nitrati u anaerobnoj fazi obrade otpadne vode pri simultanoj denitrifikaciji i uklanjanju fosfora mogu dovesti do narušavanja procesa jer se denitrifikanti i PAO_s natječu za izvor ugljika. U pokusima He i sur. (2010) nitrat je anaerobno dodavan zajedno s acetatom kako bi se održala koncentracija 10 mg L⁻¹ NO₃⁻-N tijekom 35 dana. Primijećeno je smanjenje ukupne *Candidatus Accumulibacter* kulture uzrokovano dužem izlaganju nitratu u anaerobnim uvjetima. Osim utjecaja na PAOs, anaerobna prisutnost nitrata ima utjecaj i na denitrifikante (Guerrero i sur., 2011). Primjenom DPAO_s u anaerobno/anoksično/aerobnim (A²O) uvjetima moguće je koegzistiranje PAO_s s denitrifikantima i s nitratom bez inhibicija EBPR procesa (Guerrero i sur., 2012).

2.5.7. Ioni

Za stabilizaciju i neutralizaciju negativnog naboja polifosfata nužna je prisutnost nekoliko kationa. Spektroskopijom X-zrakama otkrivena je prisutnost Mg²⁺, Ca²⁺ i K⁺ u različitim količinama koja ovisi o dostupnosti u okolini (Seviour i sur., 2003).

Ako koncentracija fosfora u vodenom mediju naraste iznad određene razine, doći će do taloženja koje ovisi o koncentraciji kalcija i pH vrijednosti. Kalcij limitira odvijanje EBPR procesa. Kod visokih koncentracija kalcija smanjuje se koncentracija polifosfata u količini u kojoj se VFA uzimaju iz okoline. Kalcij sudjeluje u stabilizaciji sintetiziranog polifosfata, ali može uzrokovati taloženje fosfata van stanice. Kalij i magnezij važni su za održavanje unutarstanične ravnoteže i zajedno s fosforom se transportiraju u i van stanice. (Barat i sur., 2008). Nekoliko istraživanja navodi da samo Mg²⁺ ioni igraju značajnu ulogu u stabilizaciji EBPR i povećanjem dostupnosti Mg²⁺ posljedično se povećava akumulacija fosfata (Seviour i sur., 2003).

2.6. Izvedbe sustava za nitrifikaciju i denitrifikaciju uz uklanjanje fosfora

Za učinkovito uklanjanje dušika i fosfora mulj mora cirkulirati kroz neaerirane (anoksične i anaerobne) i aerobne faze. Denitrifikacija se odvija u neaeriranoj ali miješanoj zoni u koju se reciklacijom uvodi prethodno nitrificirana miješana podloga iz aerobne faze. Postoje izvedbe sustava u kojima nitrifikaciji prethodi denitrifikacija, a neki od njih su sustav s 4 faze Bardenpho, modificirani Ludzak Ettinger sustav (Henze i sur., 2008).

Prilikom uklanjanja fosfora u anaerobnoj fazi PAO_s unose VFA, pretvaraju ih u PHA, a pritom se fosfor ispušta iz stanica. Tijekom oksidacije amonijaka dolazi do nakupljanja nitrata/nitrita uz pohranu fosfora u obliku poli-P.

2.6.1. Nitrifikacija s naknadnom/prethodnom denitrifikacijom

U sustavu nitrifikacije s naknadnom denitrifikacijom nitrifikacija se odvija u aerobnom reaktoru, prvom u slijedu, te se denitrifikacija odvija u anoksičnom reaktoru. Miješana suspenzija mulja i obrađene vode dopijeva u taložnik iz kojeg se istaloženi mulj recirkira u aerobni reaktor. U anoksičnim reaktorima dolazi do nakupljanja amonijaka (liza stanica) koji utječe na uklanjanje ukupnog dušika iz sustava. Kako bi se koncentracija amonijaka u reaktoru i efluentu smanjila na minimalne često se između anoksičnog reaktora i taložnika postavlja aerobni reaktor u kojemu se ujedno i stripira N_2 iz tekuće faze (Henze i sur., 2008).

U sustavu nitrifikacije uz prethodnu denitrifikaciju otpadna voda dopijeva u anoksični reaktor - denitrifikacija, potom u aerobni reaktor - nitrifikacija, te u taložnik. Voda sa nitratom se vraća iz aerobnog nitrificirajućeg reaktora unutanjom reciklacijom u denitrificirajući u koji se radi i povrat mulja vanjska reciklacija iz taložnika. Ovim sustavom nije moguće u potpunosti ukloniti nitratre jer se u prvi reaktor ne reciklira cijeli sadržaj iz aerobnog reaktora, već dio nitrata odlazi s efluentom van sustava (Henze i sur., 2008).

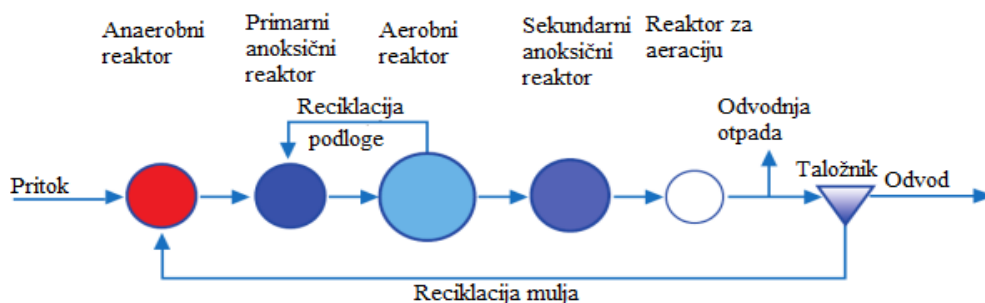
Prethodna denitrifikacija temelji se na uspostavi anoksične faze prije aerobne nitrifikacije kako bi se mulju iz anaerobne faze omogućile dovoljne količine NO_x-N ($NO_3^- -N + NO_2^- -N$).

U poboljšanom Ludzack-Ettinger sustav se dodatkom anaerobnog reaktora na početak procesa omogućilo poboljšano uklanjanje fosfora uz uklanjanje dušika (Henze i sur., 2008). U anaerobnom-anoksičnom-oksičnom procesu (A_2O , eng. *Anaerobic-Anoxic-Oxic*) povratni aktivni mulj vraća se na početak u anaerobnu fazu. U anaerobnom reaktoru dolazi do otpuštanja fosfora koji se nakupio u aerobnoj fazi te se poslije može ukloniti na određeni način. Također, direktnim vraćanjem mulja u anaerobnu fazu osigurali su se izvori ugljika za odvijanje denitrifikacije u sekundarnom reaktoru (Metcalf i Eddy, 2003).

2.6.2. Bardenpho sustav

Bardenpho sustavom s 4 stupnja poboljšano uklanjanje nitrata postignuto je uvođenjem sekundarnog anoksičnog reaktora u kojem se odvija denitrifikacija i dobiva efluent bez nitrata. U ovom sustavu nakon sekundarnog anoksičnog reaktora nalazi se aerobni reaktor koji služi za uklanjanje plinovitog dušika, ali i odvijanje naknadne oksidacije amonijaka otpuštenog tijekom denitrifikacije (Henze i sur., 1997).

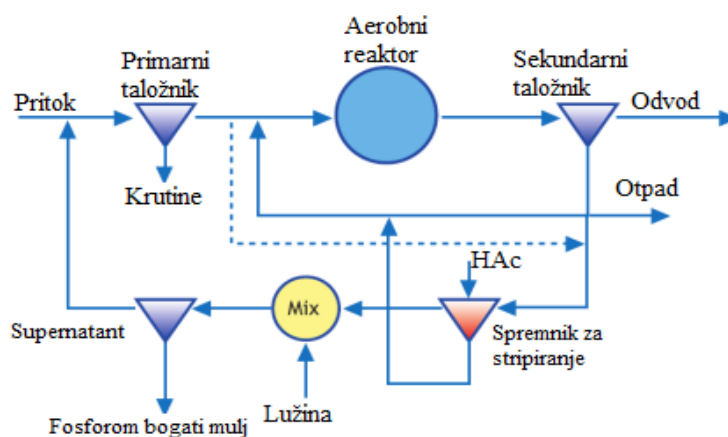
Dodatkom anaerobnog reaktora na početak procesa dobiva se Bardenpho sustav u 5 faza kojim je uz potpuno uklanjanje NO_x postignuto poboljšano uklanjanje fosfora (Slika 3). Modificirani Bardenpho sustav reducira nitrare dovoljno da nitriti tijekom recikliranja mulja u anaerobni reaktor ne remete postignuti niski redoks potencijal koji je nužan za oslobađanje P.



Slika 3. Bardenpho sustav u 5 faza (Henze i sur., 2008)

2.6.3. PhoStrip proces

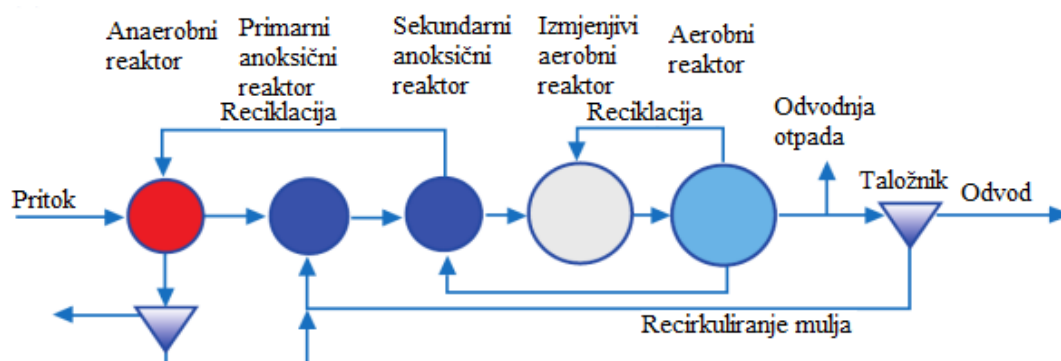
U PhoStrip procesu (Slika 4) dio recikliranog aktivnog mulja preusmjerava se u spremnik za stripiranje u kojem se otpušta fosfor, a hlapljive kiseline se skladište u obliku PHA kada se isključi dovod zraka. Nakon što se mulj slegne u spremniku za stripiranje vraća se u sustav, a u supernatant se dodaju kemikalije, najčešće vapno za taloženje otpuštenog fosfora. Iz taložnika se uklanja fosforom bogat mulj, a supernatant se vraća na početak (Metcalf i Eddy, 2003). U aerobnom rektoru potiče se aktivni mulj da uzima otopljeni fosfor u količini većoj nego što mu je potrebna za rast.



Slika 4. PhoStrip proces (Henze i sur., 2008).

2.6.4. Proces biološko-kemijskog uklanjanja dušika i fosfora

Proces biološko-kemijskog uklanjanja fosfora i dušika (BCFS, eng. *Biological-Chemical Phosphorus And Nitrogen Removal Process*) (Slika 5) razvijen je za uklanjanje fosfora, stabilizaciju mulja i optimiranje procesa uklanjanja dušika. U ovom sustavu dodano je treće recikliranje iz aeriranog reaktora u anoksični kako bi se postigla bolja denitrifikacija, a ujedno i bolje kontrolirala koncentracija amonijaka i nitrata u efluentu. Iz anoksičnog reaktora mulj recirkulira u anaerobni reaktor. U anaerobnom reaktoru odvija se kemijska obrada mulja. U anaerobnim uvjetima nakupljeni polifosfati se hidroliziraju i otpuštaju iz stanice (Popel i Jardin, 1993). Mulj se slegne na dno tanka, a supernatant se podvrgava kemijskoj obradi. Za kemijsko uklanjanje fosfora i dušika koristi se magnezij-amonijak-fosfat (MAP). MAP talog se može reciklirati tako što se zagrije i na taj način istisne amonijak, a magnezij-fosfat se ponovo koristi. Fosfor se može istaložiti i vapnom. Doziranje kemikalija mora biti pažljivo kako se ne bi narušila efikasnost EBPR procesa uslijed nedostatka fosfora za PAO_s (Hao i van Loosdrecht, 2006; Britton i sur., 2005; Booker i sur., 1999).



Slika 5. Sustav za biološko-kemijsko uklanjanje dušika i fosfora (Henze i sur., 2008)

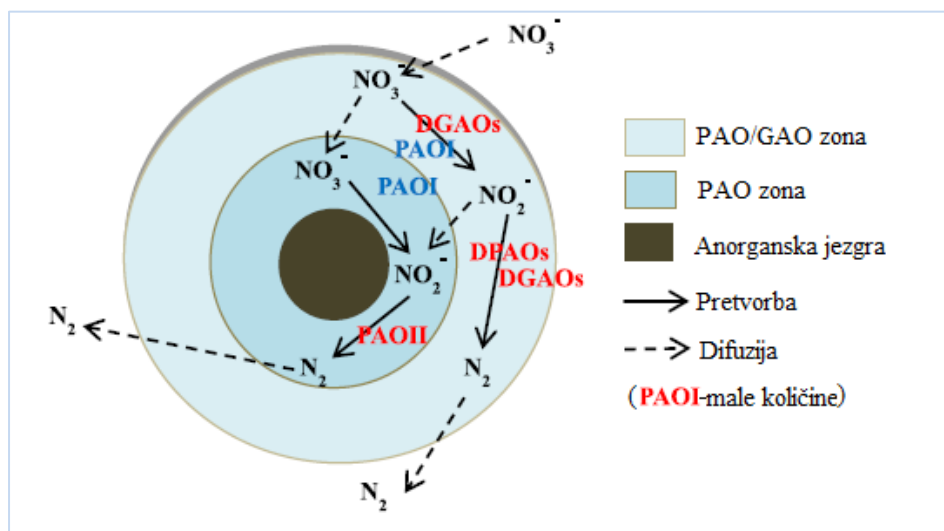
2.7. Granulirani aerobni mulj

Uporaba granuliranog aerobnog mulja u uklanjanju N i P smatra se obećavajućom tehnologijom u obradi otpadnih voda (Huang i sur., 2015; Coma i sur., 2012). Prednosti granuliranog mulja nad flokuliranim muljem su: bolja taloživost, visoka koncentracija biomase, bolja adaptacija na organski opterećenu otpadnu vodu i šokove tijekom pritoka (Huang i sur., 2015; Liu i Tay, 2004). Zbog limitiranog prijenosa kisika kroz granule mulja stvaraju se anoksične i aerobne zone (Coma i sur., 2012). Anoksični uvjeti unutar granula

omogućuju simultanu nitrifikaciju i denitrifikaciju i tako koegzistiranje nitrificirajućih i denitrificirajućih bakterija (Yan i sur., 2016).

Liu i Dong (2011) istaknuli su da se dodatkom granulirane biomase poboljšavaju procesi denitrifikacije i uklanjanja fosfata. Obogaćivanjem granuliranog mulja DPAOs kulturom eliminiraju se mogući štetni utjecaji zbog nakupljene polimerne ekstracelularne jezgre.

Model strukture višeslojnog granuliranog mulja prikazan je slikom 6.



Slika 6. Model strukture višeslojnog granuliranog mulja (Sheng i Yu, 2006).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Aktivni mulj

Aktivni mulj je podrijetlom iz uređaja za biološku obradu otpadne vode grada. Mulj je nizom naizmjeničnih pokusa nitrifikacije u aerobnim uvjetima i denitrifikacije u anoksičnim uvjetima uz vanjski izvor ugljika (natrijev acetat) aklimatiziran za uklanjanje N i P. Koncentracija aktivnog mulja je iznosila 4,3 g MLSS L⁻¹.

3.1.2. Priređena otpadna voda

Za sve pokuse uporabljena je otpadna voda priređena otapanjem soli, u kojoj je izvor NH₄-N osiguran iz 2 g (NH₄)₂SO₄/L a raspoloživa količina organskih spojeva u određenom odabranom omjeru C/N je ostvarena dodatkom natrijeva acetat (računato prema početnoj koncentraciji NH₄-N).

3.1.3. Aparatura za aerobno uklanjanje N i P

Pokusi su vođeni šaržno, u reaktoru radnog volumena 1 L, s aklimatiziranim aktivnim muljem, pri ambijentalnim uvjetima temperature, 20±1 °C.

Reaktori su opremljeni sustavom za prozračivanje tako da je reaktor iz kompresora dobavljan zrak preko sintera smještenog na dnu reaktora, a prozračivanjem je osiguran dobava otopljeni kisik i mješanje sadržaja u reaktoru.

Koncentracija otopljenog kisika, pH vrijednost i temperatura su motreni pomoću kisikove elektrode DurOx i mjernog aparata WTW 3210 Oxi i pH elektrode WTW SenTix 41 i mjernog aparata WTW 330i.

Kroz vremenski tijek u određenim razmacima uzimani su uzorci pipetom i filtrirani kroz filper pair veličine pora 45 µm i u filtratu bila je određivana koncentracija ukupnog N, NH₄⁺-N, NO₃⁻-N, NO₂⁻-N, PO₄³⁻-P i KPK.

3.2. Metode

Pokusi u kojima je istražen učinak organskog opterećenja na aerobno uklanjanje N i P provedeni su kao diskontinuirani. U laboratorijski bioreaktor dodan je aktivni mulj i odgovarajuća količina proređene otpadne vode i natrijev acetat za odabrani omjer C/N.

Na početku pokusa dušikovih oksida je bilo $\leq 15,3 \text{ mg NO}_3^- \text{-N L}^{-1}$ i $\leq 5,5 \text{ mg NO}_2^- \text{-N L}^{-1}$.

3.2.1. Fizikalno-kemijske analitičke metode

Uzorci su uzimani periodično iz reaktora, u određenim vremenskim intervalima, filtrirani kroz filter papir veličine pora $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ te su analizirani KPK, N total, $\text{NH}_4^+ \text{-N}$, $\text{NO}_3^- \text{-N}$, $\text{NO}_2^- \text{-N}$ i $\text{PO}_4^{3-} \text{-P}$.

3.2.2. Određivanje koncentracije fosfata

Fosfat u obliku ortofosfata ($\text{PO}_4^{3-} \text{-P}$) određivan je pomoću Spectroquant 1.14842 seta tvrtke Merck (Njemačka) za područje raspona koncentracije od $1\text{-}30 \text{ mg PO}_4^{3-} \text{-P L}^{-1}$. Metoda se bazira na reakciji iona ortofosfata s amonijevim vanadatom i amonijevim heptamolibdatom pri čemu nastaje žuto obojena, molibdovanadat fosforna kiselina. Koncentracija molibdovanadat fosforne kiseline određuje se fotometrijski.

Postupak: 5 mL prethodno profiltriranog i po potrebi destiliranom vodom razrijeđenog uzorka u granicama koncentracijskog raspona metode otpipetira se u staklenu kivetu. Zatim se doda $1,2 \text{ mL PO}_4\text{-1}$ reagensa. Kiveta se dobro zatvori i promućka. Tijekom 10 minuta nastaje žuto obojenje i izmjeri se apsorbancija u fotometru.

3.2.3. Određivanje koncentracije nitrata

Određivanje $\text{NO}_3^- \text{-N}$ provedeno je pomoću Merck Spectroquant 1.14773 seta za područje koncentracije $0,5\text{-}20 \text{ mg NO}_3^- \text{-N L}^{-1}$. Metoda određivanja temelji se na reakciji nitratnih iona u sumpornoj kiselini s derivatom benzojeve kiseline pri čemu nastaje crveni nitro spoj koji se određuje fotometrijski.

Postupak: U staklenu kivetu doda se $1,5 \text{ mL}$ uzorka (prethodno profiltriranog i po potrebi razrijeđenog s destiliranom vodom do koncentracijskog raspona metode) i 1 žličica $\text{NO}_3\text{-1}$ reagensa. Kiveta se potom dobro zatvori i mućka dok se reagens ne otopi u uzorku. Zatim se dodaje 5 mL koncentrirane sumporne kiseline, dobro zatvori kivetu i promućka pri čemu

dolazi do zagrijavanja uzorka. Reakcija se odvija 10 minuta nakon čega se izmjeri apsorbancija crvenog obojenja.

3.2.4. Određivanje koncentracije nitrita

Metoda određivanja nitrita, pomoću Merck Spectroquant 1.14776 seta, temelji se na reakciji nitrita sa sulfanilnom kiselinom uz nastanak diazonijeve soli, koja reagira s N-(1-naftil) etilendiamin dihidroklorom i tvori crveno-ljubičastu azo boju. Metoda je u rasponu koncentracija od 0,02 do 1,00 mg NO₂⁻-N L⁻¹. Obojenje se mjeri fotometrijski.

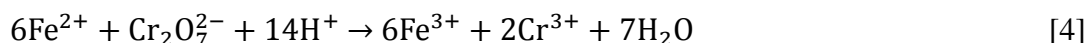
Postupak: U staklenu kivetu otpipetira se 5 mL uzorka (prethodno profiltriranog i po potrebi razrijeđenog s destiliranom vodom do koncentracijskog raspona metode) i doda se jedna žličica praškastog NO₂-1 reagensa. Zatvori se kiveta i mućka dok se reagens ne otopi u uzorku. Nakon 10 minuta izmjeri se apsorbancija.

3.2.5. Određivanje koncentracije amonijaka

Postupak: Uzme se uzorak, profiltrira se kroz grubi filter papir. U odmjernoj tikvici od 50 mL pripremi se otopina masene koncentracije unutar zadanog mjernog područja (1-3 mg L⁻¹). Potom se dodaju 2 kapi K-Na tartarata i 1 kap Nesslerova reagensa (otopina HgI₂ u KI). Tijekom 10 min razvija se žuta boja. Izmjeri se apsorbancija.

3.2.6. Određivanje kemijske potrošnje kisika (KPK)

KPK vrijednost predstavlja količinu oksidansa koji se utroši za oksidaciju organskih sastojaka prisutnih u uzorku, tj. predstavlja utrošak kalijeva bikromata (K₂Cr₂O₇) potrebnog za oksidaciju organske stvari izražene kao mg O₂ L⁻¹. Za potpunu oksidaciju organskih spojeva dodaje se srebrov sulfat (Ag₂SO₄) kao katalizator reakcije. Za sprečavanje oksidacije nekih anorganskih spojeva, poput klorida, dodaje se živin (II) sulfat (HgSO₄). Višak kalijeva bikromata titrira se otopinom feroamonijeva sulfata (FAS) ((NH₄)₂Fe(SO₄)₂·6H₂O) kao što je prikazano u jednadžbi [4].



Zbog nestabilnosti otopine feroamonijeva sulfata potrebno je odrediti faktor otopine titracijom standardne otopine kalijeva bikromata s feroamonijevim sulfatom prije određivanja KPK. Faktor otopine (f) je omjer volumena otopine K₂Cr₂O₇ + HgSO₄ i (NH₄)₂Fe(SO₄)₂·6H₂O. Određuje se tako da se u staklenu kivetu otpipetira 2 mL destilirane vode i doda 1,2 mL otopine kalijeva bikromata + HgSO₄ i 2,8 mL otopine Ag₂SO₄ + H₂SO₄. Staklena kiveta se dobro začepi, promućka i stavi na tamno mjesto da se ohladi. Nakon hlađenja uzorak se titrira

otopinom FAS uz dodatak feroin indikatora do promjene boje iz plavo/zelene u smeđe/crvenu. Faktor otopine se računa prema jednadžbi [5].

$$f = \frac{1,2}{V_{fas}} \quad [5]$$

gdje je:

1,2 - volumen (mL) otopine $K_2Cr_2O_7 + HgSO_4$

V_{fas} - volumen (mL) FAS otopine utrošene za titraciju

Postupak: u staklenu kivetu otpipetira se 2 mL uzorka, doda 1,2 mL otopine $K_2Cr_2O_7 + HgSO_4$ i 2,8 mL otopine $Ag_2SO_4 + H_2SO_4$. Staklena kiveta se dobro zatvori i promućka. Kiveta se zatim spaljuje u termoreaktoru na 150 °C sat vremena. Nakon 1h kiveta se izvadi iz termoreaktora i stavlja u tamu dok se ne ohladi na sobnu temperaturu. Kad se uzorak ohladi, titrira se otopinom FAS ($c = 0,1$ mol/L) uz feroin kao indikator do promjene boje iz plavo/zelene do smeđe/crvene. Slijepa proba priprema se isto kao uzorak, jedina je razlika što se umjesto 2 mL uzorka dodaje 2 mL destilirane vode.

KPK vrijednost se računa prema jednadžbi [6].

$$KPK \left[\frac{mgO_2}{L} \right] = \frac{(V_1 - V_2) \times c \times f \times 8000}{V_{uzorka}} \quad [6]$$

gdje je:

V_1 -volumen [mL] FAS utrošen za titraciju slijepe probe

V_2 -volumen [mL] FAS utrošen za titraciju uzorka

c-koncentracija FAS (0,1 mol/L)

f-faktor otopine FAS

3.2.7. Određivanje koncentracije ukupnog dušika

Za određivanje koncentracije dušika koristi se set br. 1. 14764 Spectroquant tvrtke Merck (Njemačka). Metoda se temelji na pretvorbi organskog i anorganskog dušika u nitrata u prisutnosti oksidirajućih tvari u termoreaktoru. Nastali nitrati se s 2,6-dimetilfenolom pretvaraju u 4-nitro-2,6-dimetilfenol koji je crveno obojen.

Postupak: u praznu kivetu se doda 10 mL prethodno profiltriranog uzorka, 1 kap R1 reagens (K₂CO₃) te se kiveta dobro zatvori i promućka. Potom se u kivetu doda 6 kapi R2 reagens (K₂S₂O₈). Priređeni uzorak kuha se u termoreaktoru na 120 °C jedan sat. Nakon kuhanja kiveta se stavlja hladiti na tamno mjesto. Za 10 min uzorak se protrese. Nakon hlađenja uzorak se profiltrira se kroz grubi filter papir i po potrebi razrijedi do zadanog raspona koncentracije metode. Apsorbancija se mjeri na 525 nm.

3.2.8. Određivanje koncentracije otopljenog kisika

Koncentracija otopljenog kisika određivana je pomoću kisikove elektrode DurOx i mjerača otopljenog kisika WTW Oxi3210. Instrument je prije upotrebe umjeren prema uputama proizvođača. Elektroda je tijekom trajanja procesa bila uronjena u bioreaktor te je vrijednost koncentracije otopljenog kisika prikazana na zaslonu uređaja.

3.2.9. Određivanje temperature

Temperatura je određivana pomoću temperaturnog senzora s kisikove elektrode (WTW Oxi3210 i DurOx) i pH elektrode (WTW 330i i SenTix41) očitavanjem sa zaslona elektroda.

3.2.10. Određivanje pH vrijednosti

Vrijednost pH mjerena je pH-metrom WTW 330i i pH elektrodom SenTix41. pH elektroda je tijekom pokusa bila uronjena u bioreaktor te je očitavana vrijednost prikazana na zaslonu pH-metra. Svakodnevno je prije mjerenja pH vrijednosti provođeno umjeravanje elektrode uranjanjem u pufer otopinu s pH 4 i 7. Nakon završetka mjerenja elektroda je isprana destiliranom vodom te čuvana u zasićenoj otopini kalijeva klorida.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U posljednje vrijeme uređaji za obradu opadnih voda imaju prioritetan zadatak postići visoku učinkovitost uklanjanja N i P iz otpadne vode s manjom potrošnjom energije.

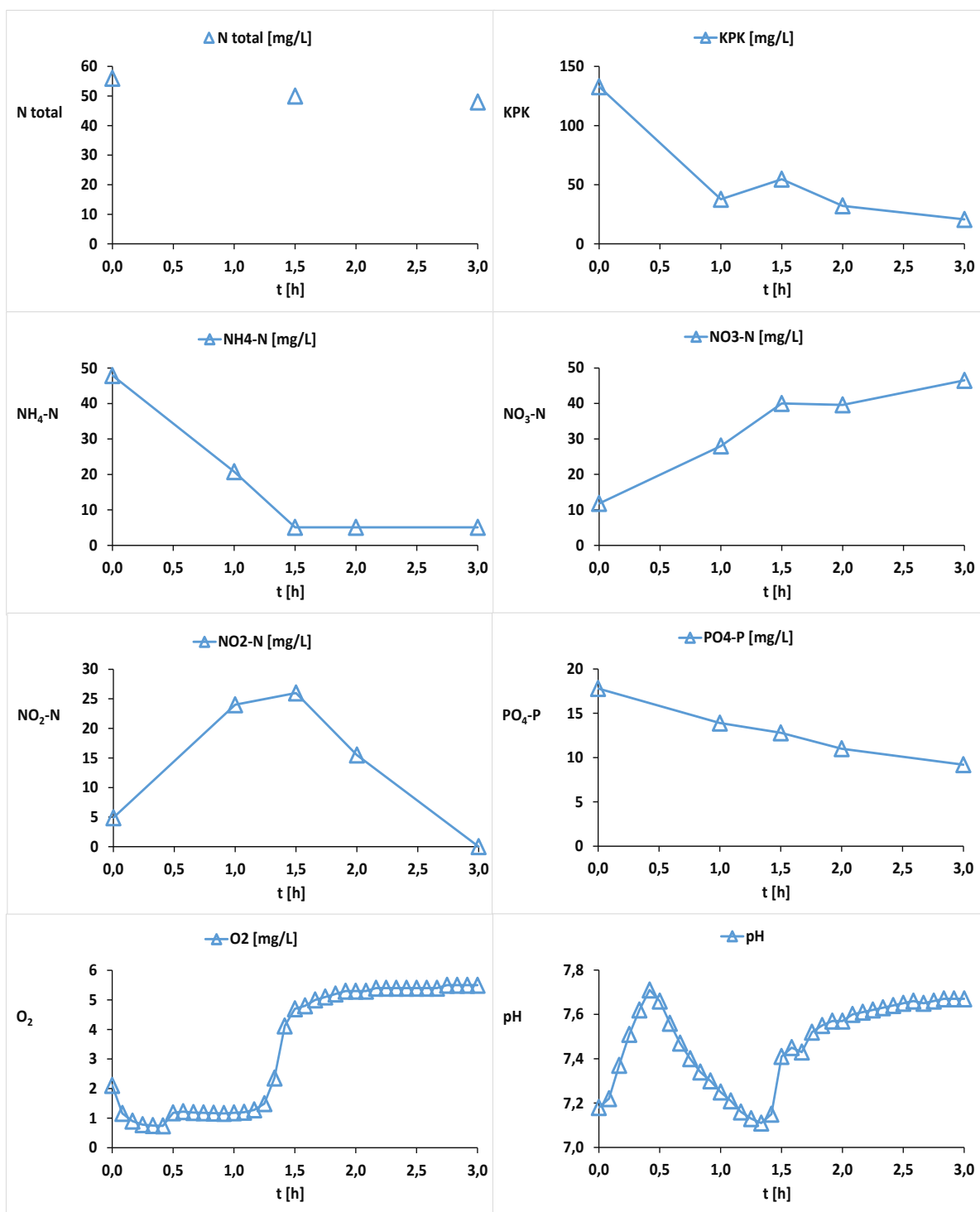
U praksi se često koriste procesi za istovremeno uklanjanje N i P iz otpadnih voda, koji se baziraju na aktivnosti PAO_s, nitrifikanata i denitrifikanata. Budući da je PAO_s potreban organski ugljik za otpuštanje fosfata, a denitrifikantima za denitrifikaciju, u otpadnim vodama koje imaju niski omjer KPK/N može doći do manjka organskog ugljika potrebnog i za PAO_s unos ugljika i za denitrifikaciju denitrifikanata (Kuba i sur., 1994).

Biološko uklanjanje dušika uključuje aerobnu nitrifikaciju, oksidaciju amonijaka preko nitrita do nitrata, i anoksičnu ili anaerobnu denitrifikaciju, redukciju nitrata preko nitrita do plinovitog dušika. EPBR procesom postiže se biološko uklanjanje fosfora, koje se temelji na unosu fosfora pomoću PAO_s i unutarstaničnu pohranu PO₄³⁻-P u koncentracijama većim nego što su potrebne za stanični metabolizam. PAO_s djeluju u naizmjeničnim anaerobnim i aerobnim/anoksičnim uvjetima. U ovim sustavima prisutni su i DPAOs koji istovremeno uklanjaju nitrata iz sustava i skladište fosfate (Metcalf i Eddy, 2003).

Kako se u biološkom uklanjanju N i P ovisno o procesnim čimbenicima i uvjetima okoliša zbivaju mikrobne reakcije, istražen je učinak raspoloživog biološki razgradivog ugljika (organsko opterećenje) na aktivnost pojedinih skupina mikroorganizama odgovornih za ciljane biološke procese nitrifikacije, denitrifikacije i biološkog nagomilavanja fosfata.

S ciljem definiranja učinka organskog opterećenja na uklanjanje N i P, provedeni su pokusi u kojima je istražen učinak izvora ugljika (natrijev acetat) dodan na početku svakog pokusa prema zadanom odabranom omjeru C/N (prema početnoj koncentraciji NH₄⁺-N) na brzinu bioloških reakcija i učinkovitost procesa uklanjanja N i P.

Istraženo je aerobno uklanjanje nutrijenata početne koncentracije 10,7-18,2 mg PO₄³⁻-P L⁻¹ (14,5±3,8) i 48±1,3 mg NH₄⁺-N L⁻¹ uz dodani natrijev acetat prema početnoj koncentraciji NH₄⁺-N za odabrane omjere C/N 1, 3, 4, 5, 6 i 7 (Slike 7 – 14).



Slika 7. Aerobno uklanjanje N i P pri omjeru C/N 1

Pri omjeru C/N 1, u pokusu aerobnog uklanjanja N i P, tijekom 3 sata, od početnih 132,9 mg KPK L⁻¹, 47,9 mg NH₄⁺-N L⁻¹, 11,8 mg NO₃⁻-N L⁻¹ i 4,9 mg NO₂-N/L i 17,8 mg PO₄³⁻P L⁻¹ postignuto je 14,3% uklanjanje N, 48,3% uklanjanje P i 84% uklanjanje KPK (Slike 7 i 13).

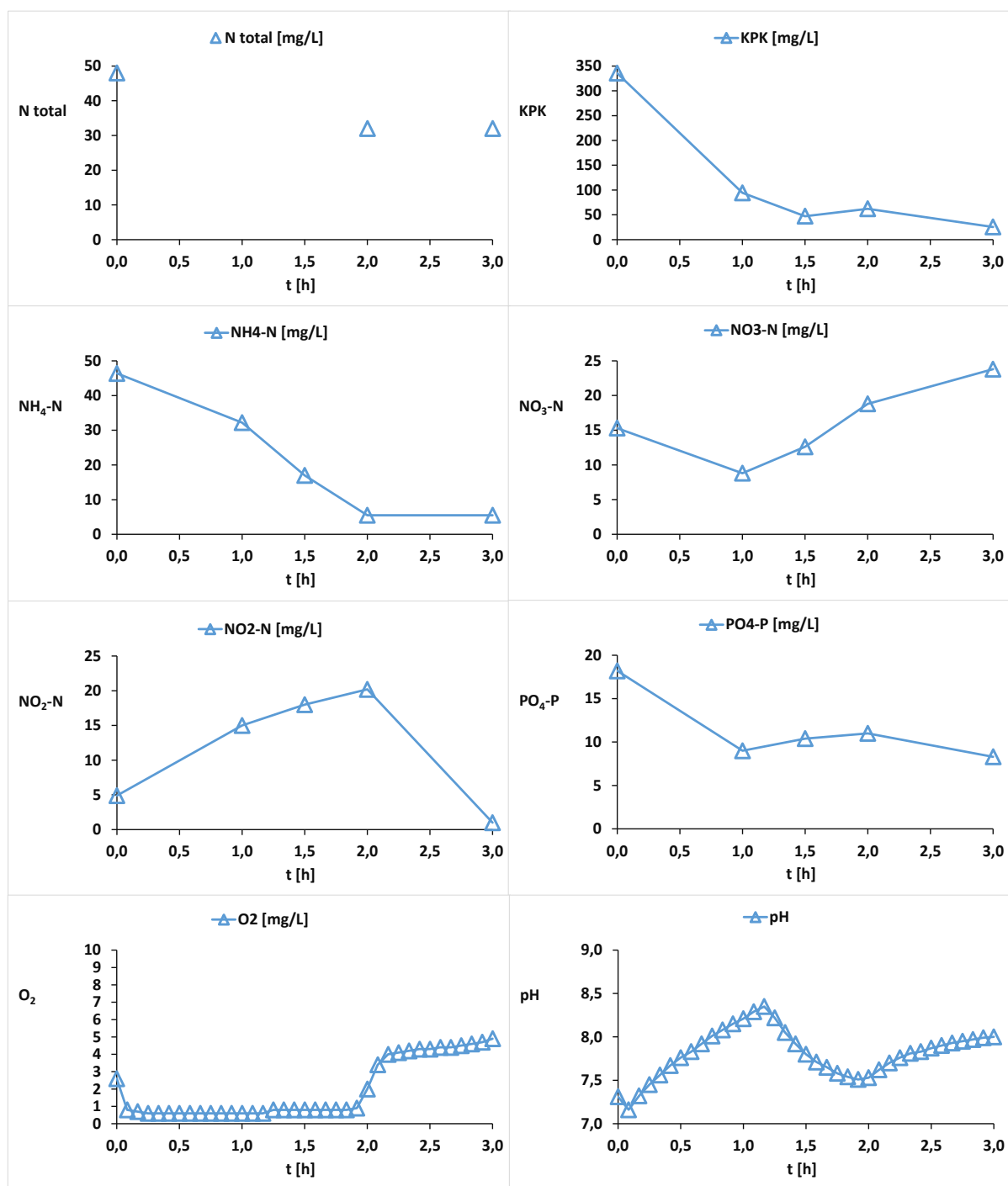
KPK je utrošen tijekom 1. sata pokusa, brzinom $95,2 \text{ mg KPK L}^{-1}\text{h}^{-1}$. Istovremeno s oksidacijom KPK zbivala se oksidacija $\text{NH}_4^+\text{-N}$, koji je potpuno oksidiran tijekom 1,5 sati pokusa pri čemu je $47,9 \text{ mg NH}_4^+\text{-N L}^{-1}$ prevedeno u $28,2 \text{ mg NO}_3^-\text{-N L}^{-1}$ i $19,1 \text{ mg NO}_2^-\text{-N L}^{-1}$, a daljnjim vođenjem pokusa u aerobnim uvjetima sav $\text{NO}_2^-\text{-N}$ je preveden u $\text{NO}_3^-\text{-N}$ te je do kraja pokusa u 3. satu nakupljeno $34,7 \text{ mg NO}_3^-\text{-N L}^{-1}$.

Tijekom nitrifikacije maksimalna vrijednost od $26 \text{ mg NO}_2^-\text{-N L}^{-1}$ je nakupljena u 1,5. satu pokusa, kada je sav $\text{NH}_4^+\text{-N}$ oksidiran. Brzina oksidacije $\text{NH}_4^+\text{-N}$ je iznosila $31,9 \text{ mg NH}_4^+\text{-N (Lh)}^{-1}$ a brzina nitrifikacije $15,9 \text{ mg (Lh)}^{-1}$.

Uklanjanje P se odvijalo kontinuirano, istovremeno s procesima oksidacije KPK i $\text{NH}_4^+\text{-N}$, i to brzinom od $2,9 \text{ mg PO}_4^{3-}\text{-P (Lh)}^{-1}$. Iako je raspoloživi KPK (dodan na početku pokusa) potpuno utrošen u 1. satu pokusa, uklanjanje $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ se odvijalo svih 3 sata pokusa (Slike 7 i 13).

Kisik se od početka procesa trošio za oksidaciju KPK i za oksidaciju $\text{NH}_4^+\text{-N}$, prilikom koje se oslobađaju H^+ ioni koji snizuju pH. Nakon utroška većine KPK (tijekom 0,5 sati pokusa) od 0,5. sata pokusa zabilježeno je blago povećanje koncentracije otopljenog kisika koji se sada troši uglavnom za proces oksidacije $\text{NH}_4^+\text{-N}$ i iznosi oko 1 mg L^{-1} . Nakon oksidacije $\text{NH}_4^+\text{-N}$ u 1,5. satu uočava se značajan porast u koncentraciji otopljenog kisika jer se sada raspoloživi otopljeni kisik troši za prevođenje $\text{NO}_2^-\text{-N}$ u $\text{NO}_3^-\text{-N}$ (Slike 7 i 14).

Mikrobne reakcije razgradnje organskih sastojaka te oksidacije $\text{NH}_4^+\text{-H}$ su vidljive i u profilu pH vrijednosti. Tijekom 0,5 sati procesa pH raste do pH 7,8 zbog aerobne denitrifikacije. Potom se pH snižava uslijed oslobađanja H^+ iona tijekom nitrifikacije. Od 1,5. sata pH pokazuje porast vrijednosti (Slike 7 i 14).



Slika 8. Aerobno uklanjanje N i P pri omjeru C/N 3

U pokusu uklanjanja N i P u aerobnim uvjetima, pri omjeru C/N 3, od početnih 335,7 mg KPK L⁻¹, 46,4 mg NH₄⁺-N L⁻¹, 15,3 mg NO₃⁻-N L⁻¹ i 4,9 mg NO₂⁻-N L⁻¹ i 18,2 mg PO₄³⁻-P L⁻¹ postignuto je 33,3% uklanjanje N, 54,4% uklanjanje P i 92,4% uklanjanje KPK (Slike 8 i 13). Pokus je proveden tijekom 3 sata.

KPK je utrošen tijekom prvih 1,5 sati pokusa, a brzina uklanjanja KPK je iznosila $192,3 \text{ mg KPK (Lh)}^{-1}$.

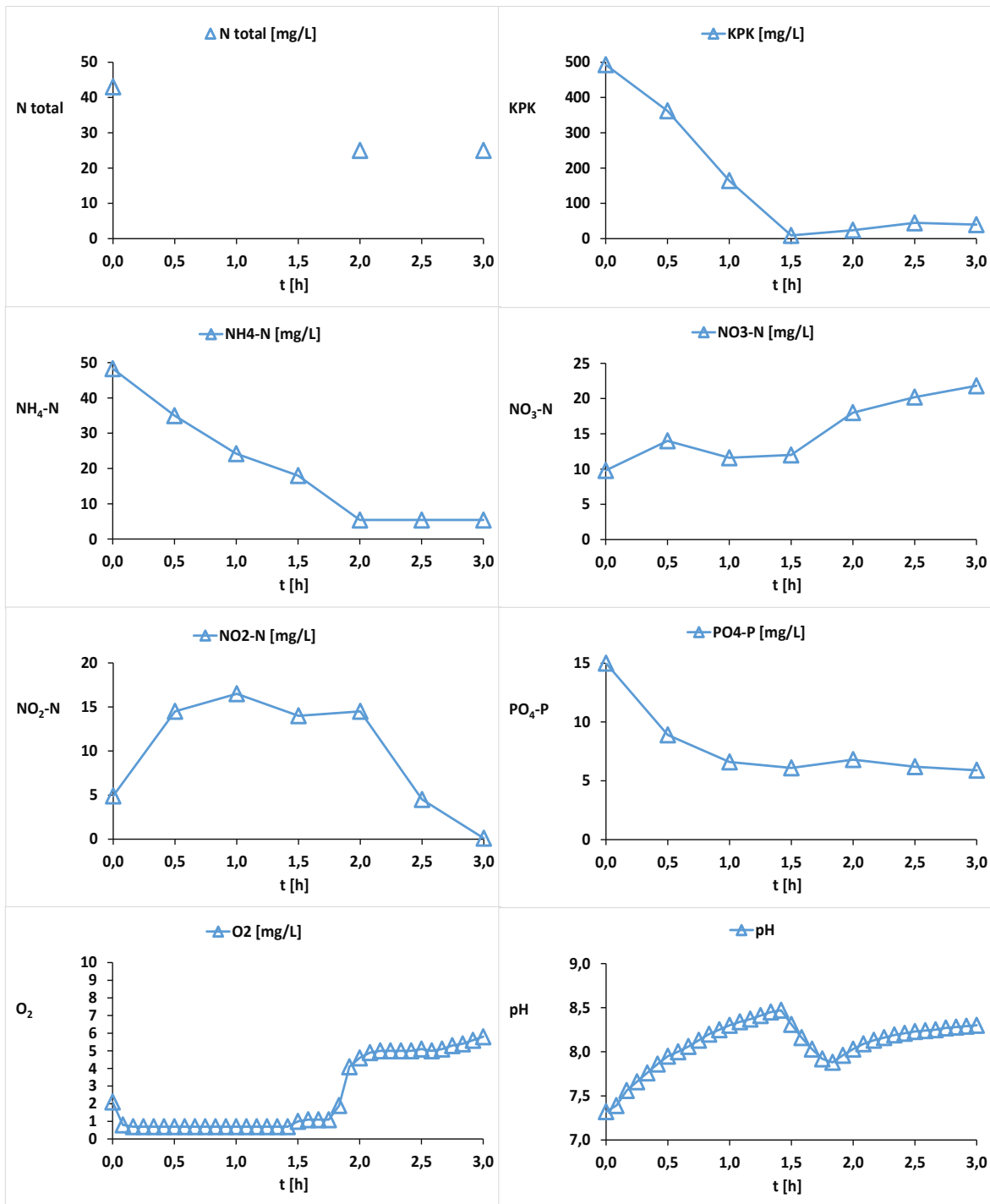
$\text{NH}_4^+\text{-N}$ je oksidiran tijekom 2 sata pokusa, a oksidacija $\text{NH}_4^+\text{-N}$ se odvijala sporije tijekom prvih sat vremena pokusa uz istovremenu oksidaciju i KPK, i to brzinom od $14,2 \text{ mg NH}_4^+\text{-N (Lh)}^{-1}$, a idućih sat vremena pokusa $\text{NH}_4^+\text{-N}$ je oksidiran brzinom od $32,2 \text{ mg NH}_4^+\text{-N (Lh)}^{-1}$, što je rezultiralo sveukupnom brzinom oksidacije $23,2 \text{ mg NH}_4^+\text{-N (Lh)}^{-1}$. Brzina nitrifikacije je iznosila $15,5 \text{ mg (Lh)}^{-1}$ (Slike 8 i 13).

Prvih sat vremena pokusa, dok se zbivala oksidacija KPK i oksidacija $\text{NH}_4^+\text{-N}$, odvijala se i aerobna denitrifikacija. Naime, $\text{NO}_3^-\text{-N}$ se smanji od početnih $15,3 \text{ mg NO}_3^-\text{-N L}^{-1}$ na $8,8 \text{ mg NO}_3^-\text{-N L}^{-1}$ tijekom 1. sata pokusa, a do kraja pokusa nitrifikacije, u 3. satu koncentracija je iznosila $23,8 \text{ mg NO}_3^-\text{-N L}^{-1}$, odnosno tijekom cijelog pokusa nakupljeno je $8,5 \text{ mg NO}_3^-\text{-N L}^{-1}$. Tijekom oksidacije $\text{NH}_4^+\text{-N}$ zabilježeno je konstantno nakupljanje $\text{NO}_2^-\text{-N}$ koji vrhunac od $20,2 \text{ mg NO}_2^-\text{-N L}^{-1}$ dostižu u 2. satu pokusa, u točki potpune oksidacije $\text{NH}_4^+\text{-N}$. Do kraja pokusa provedbom potpune nitrifikacije sav $\text{NO}_2^-\text{-N}$ su potpuno oksidira i prevodi u $\text{NO}_3^-\text{-N}$ (Slike 8 i 13).

Uklanjanje $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ se odvijalo prvih sat vremena pokusa kada je uklonjeno $50,5\% \text{ PO}_4^{3-}\text{-P}$ brzinom $9,2 \text{ mg PO}_4^{3-}\text{-P (Lh)}^{-1}$, a narednih dva sata pokusa zabilježene su fluktuacije vrijednosti, i do kraja pokusa je uklonjeno $54,4\% \text{ PO}_4^{3-}\text{-P}$. Brzina uklanjanja P iznosila je $3,3 \text{ mg PO}_4^{3-}\text{-P (Lh)}^{-1}$ (Slike 8 i 13).

Koncentracija otopljenog kisika odražava mikrobne reakcije prvo oksidacije KPK tijekom 1-1,5 sati pokusa, nakon uklonjenog KPK zabilježen je porast koncentracije otopljenog kisika koji je potom korišten za oksidaciju $\text{NH}_4^+\text{-N}$, a nakon potpune oksidacije $\text{NH}_4^+\text{-N}$ opet se prepoznaje točka porasta koncentracije otopljenog kisika koji se nadalje koristi za prevođenje $\text{NO}_2^-\text{-N}$ u $\text{NO}_3^-\text{-N}$. Također, završetak nitrifikacije se prepoznaje u profilu otopljenog kisika opet u točki porasta koncentracije otopljenog kisika (Slike 8 i 14).

Profil pH također odražava tijek mikrobnih reakcija, u 1. satu pH vrijednost dostiže maksimum, nakon čega tijekom oksidacije $\text{NH}_4^+\text{-N}$ pada pH vrijednost, a točka završetka oksidacije $\text{NH}_4^+\text{-N}$ i najveće koncentracije nakupljenog $\text{NO}_2^-\text{-N}$ se prepoznaje po porastu pH vrijednosti. Nadalje je zabilježen lagani porast pH (Slike 8 i 14).



Slika 9. Aerobno uklanjanje N i P pri omjeru C/N 4

U aerobnom uklanjanju N i P pri omjeru C/N 4 od početnih 492,2 mg KPK L⁻¹, 48,3 mg NH₄⁺-N L⁻¹, 9,8 mg NO₃⁻-N L⁻¹ i 4,9 mg NO₂⁻-N L i 15,0 mg PO₄³⁻-P L⁻¹ tijekom 3 sata pokusa, postignuto je uklanjanje 41,9% N i 60,7% P. To je ujedno i najveće postignuto uklanjanje P, od svih istraženih odabranih omjera C/N (Slike 9 i 13).

KPK se uklanjao brzinom 322,6 mg KPK(Lh)⁻¹ i tijekom 1,5 sati pokusa postignuto je 98,2% uklanjanje (Slike 9 i 13).

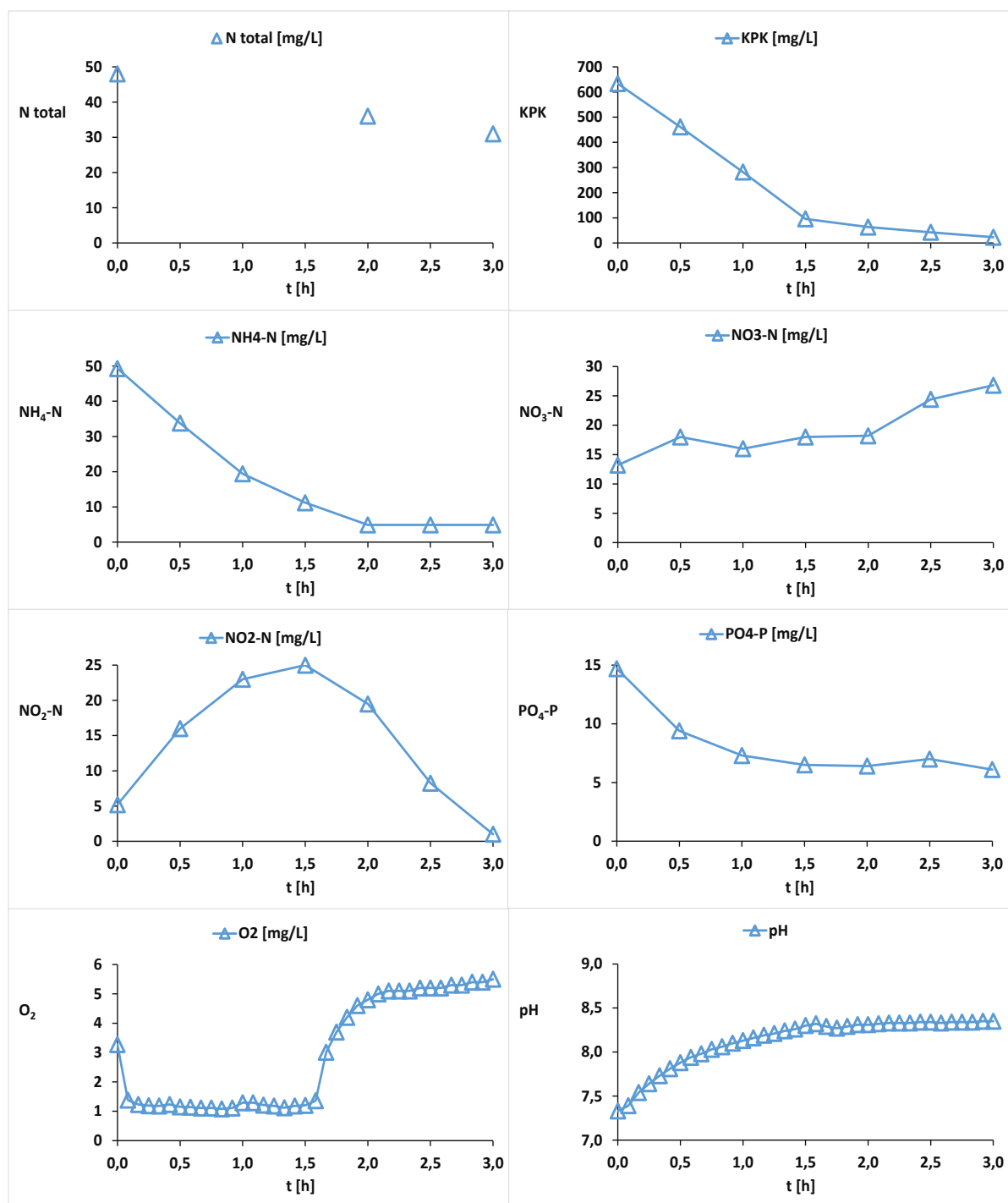
Oksidacija NH₄⁺-N se zbila istovremeno uz oksidaciju KPK, ujednačenom brzinom od 24,2 mg NH₄⁺-N(Lh)⁻¹ i NH₄⁺-N je potpuno oksidiran u 2. satu pokusa. Brzina nitrifikacije je iznosila 16,1 mg (Lh)⁻¹. Tijekom nitrifikacije nakupljeno je 12 mg NO₃⁻-N L⁻¹, koji su se za vrijeme oksidacije KPK prvih 1,5 sati pokusa nakupili sa početnih 9,8 mg NO₃⁻-N L⁻¹ na 12 mg NO₃⁻-N L⁻¹, a do kraja pokusa u 3. satu su porasli na 21,8 mg NO₃⁻-N L⁻¹.

Pri omjeru C/N 4 vidljiva je još izraženija aerobna denitrifikacija, tako dok je bilo raspoloživog KPK u reaktoru prevođenje NH₄⁺-N u NO₂⁻-N+NO₃⁻-N nije zabilježeno u ekvivalentnoj količini dušikovih oksida. Maksimum NO₂⁻-N je ostvaren u 1. satu pokusa, 16,5 mg NO₂⁻-N L⁻¹, i na kraju nitrifikacije, u 3. satu, potpuno je NO₂⁻-N preveden u NO₃⁻-N (Slike 9 i 13).

Većina P, 56%, je uklonjena tijekom 1. sata pokusa i to brzinom 8,4 mg PO₄³⁻-P (Lh)⁻¹, a do kraja pokusa u 3. satu postignuto je ukupno uklanjanje P 60,7%. Uklanjanje P se tijekom cijelog pokusa odvijalo brzinom 3 mg PO₄³⁻-P (Lh)⁻¹ (Slika 9).

Profili pH i otopljenog kisika odražavaju tijek mikrobnih reakcija i aktivnost pojedinih skupina mikroorganizama. Koncentracija otopljenog kisika je u prvih 1,5 sati pokusa iznosila 0,7 mg L⁻¹ tijekom intenzivne oksidacije KPK i oksidacije NH₄⁺-N, nakon koje je uslijedio porast koncentracije otopljenog kisika na 1 mg L⁻¹ u 1,5. satu tijekom daljnje oksidacije NH₄⁺-N. Završetak oksidacije NH₄⁺-N opet se prepoznaje u profilu otopljenog kisika u točki porasta otopljenog kisika koji se nadalje upotrebljuje za potpunu nitrifikaciju odnosno prevođenje NO₂⁻-N u NO₃⁻-N (Slike 9 i 14). Potpuna nitrifikacija se u profilu otopljenog kisika prepoznaje točkom porasta vrijednosti otopljenog kisika (Slike 9 i 14).

pH vrijednost raste tijekom 1,5. sata vođenja procesa i dostigla je svoj maksimum 8,5. Tijekom narednih pola sata uočava se pad pH vrijednosti. Nakon 2. sata ponovo su zabilježene više pH vrijednosti (Slike 9 i 14).



Slika 10. Aerobno uklanjanje N i P pri omjeru C/N 5

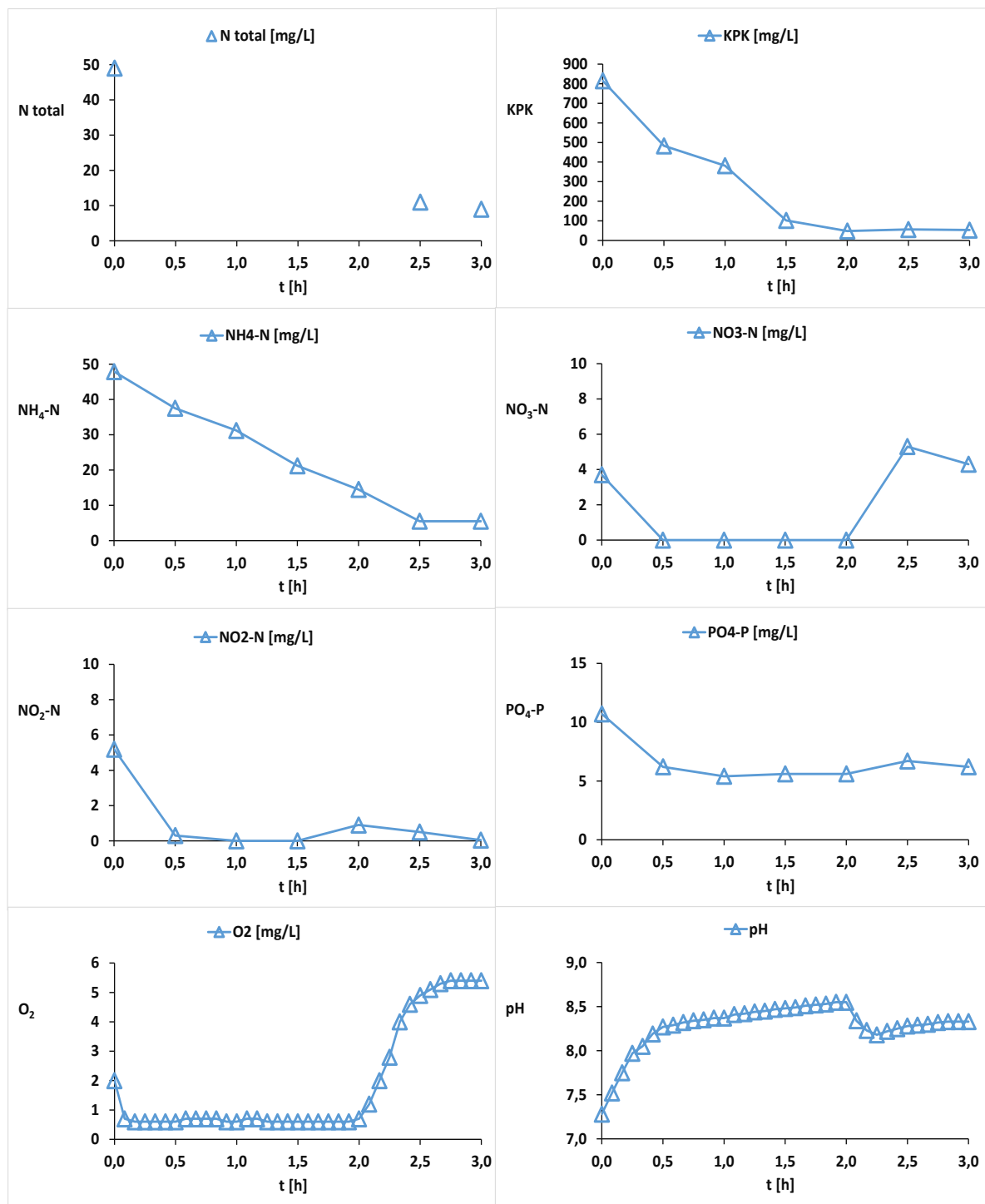
Uklanjanje N i P u aerobnim uvjetima, uz raspoložive organske sastojke dodane za odabrani omjer C/N 5, tijekom 3 sata pokusa, rezultirala 35,4 % uklanjanjem N, 58,5% uklanjanjem P i 96,4% uklanjanjem KPK (Slike 10 i 13), od početnih 633,4 mg KPK L⁻¹, 49,3 mg NH₄⁺-NL⁻¹, 13,2 mg NO₃⁻-N L⁻¹ i 5,2 mg NO₂⁻-N L⁻¹ i 14,7 mg PO₄³⁻-P L⁻¹.

Uklanjanje KPK brzinom od 358,3 mg KPK (Lh)⁻¹ provedeno je tijekom 1,5 sati pokusa, a istovremeno se zbila i oksidacija NH₄⁺-N, koja je završila u 2. satu pokusa (Slike 10 i 13). Brzina oksidacije NH₄⁺-N je iznosila 24,7 mg NH₄⁺-N (Lh)⁻¹, a brzina nitrifikacije 16,4 mg (Lh)⁻¹. Tijekom oksidacije NH₄⁺-N, nakupljali su se NO₂⁻-N uz maksimum vrijednosti u 1,5. satu pokusa i iznosili su 25 mg NO₂⁻-N L⁻¹, a do kraja pokusa u 3. satu pokusa potpuno su prevedeni u NO₃⁻-N. Istovremeno, tijekom prva dva sata pokusa akumulirano je 5 mg NO₃⁻-N L⁻¹, a u idućih sat vremena pokusa još 8,6 mg NO₃⁻-N L⁻¹, što je sveukupno činilo 13,6 mg NO₃⁻-N L⁻¹ na kraju nitrifikacije (Slike 10 i 13).

Većina P, i to 55,8 % P je uklonjeno tijekom prvih 1,5 sati pokusa brzinom 5,5 mg PO₄³⁻-P (Lh)⁻¹, istovremeno sa uklanjanjem KPK. Do kraja pokusa u 3. satu uklonjeno je sveukupno 58,5% P brzinom 2,9 mg PO₄³⁻-P (Lh)⁻¹ (Slike 10 i 13).

I u ovom pokusu zabilježen je značajan utrošak otopljenog kisika tijekom oksidacije KPK i NH₄⁺-N, a daljnja vrijednost koncentracije otopljenog kisika pokazuje porast koncentracije (Slike 10 i 14).

Porast pH vrijednosti se opaža tijekom cijelog procesa te se nakon 2. sata pokusa održava na neznatno kolebljivim vrijednostima (Slike 10 i 14).



Slika 11. Aerobno uklanjanje N i P pri omjeru C/N 6

Pri odabranom omjeru C/N 6 u uklanjanaju N i P u aerobnim uvjetima zabilježeno je 77,6% uklanjanje N, 37,4% uklanjanje P i 94,1% uklanjanje KPK (Slike 11 i 13), od početnih 815,4

mg KPK L^{-1} , 47,9 mg $NH_4^+-N L^{-1}$, 3,7 mg $NO_3^--N L^{-1}$ i 5,2 mg $NO_2^--N L^{-1}$ i 10,7 mg $PO_4^{3-}-P L^{-1}$. Proces je trajao 3 sata.

KPK se prvih 1,5 sati uklanja brzinom 475,5 mg KPK $(Lh)^{-1}$ i pri tome je uklonjeno 87,5% raspoloživog KPK, a daljnje uklanjanje do ukupno 94,1% uklonjenog KPK je osvareno daljnjih pola sata pokusa brzinom od 108 mg KPK $(Lh)^{-1}$ (Slike 11 i 13).

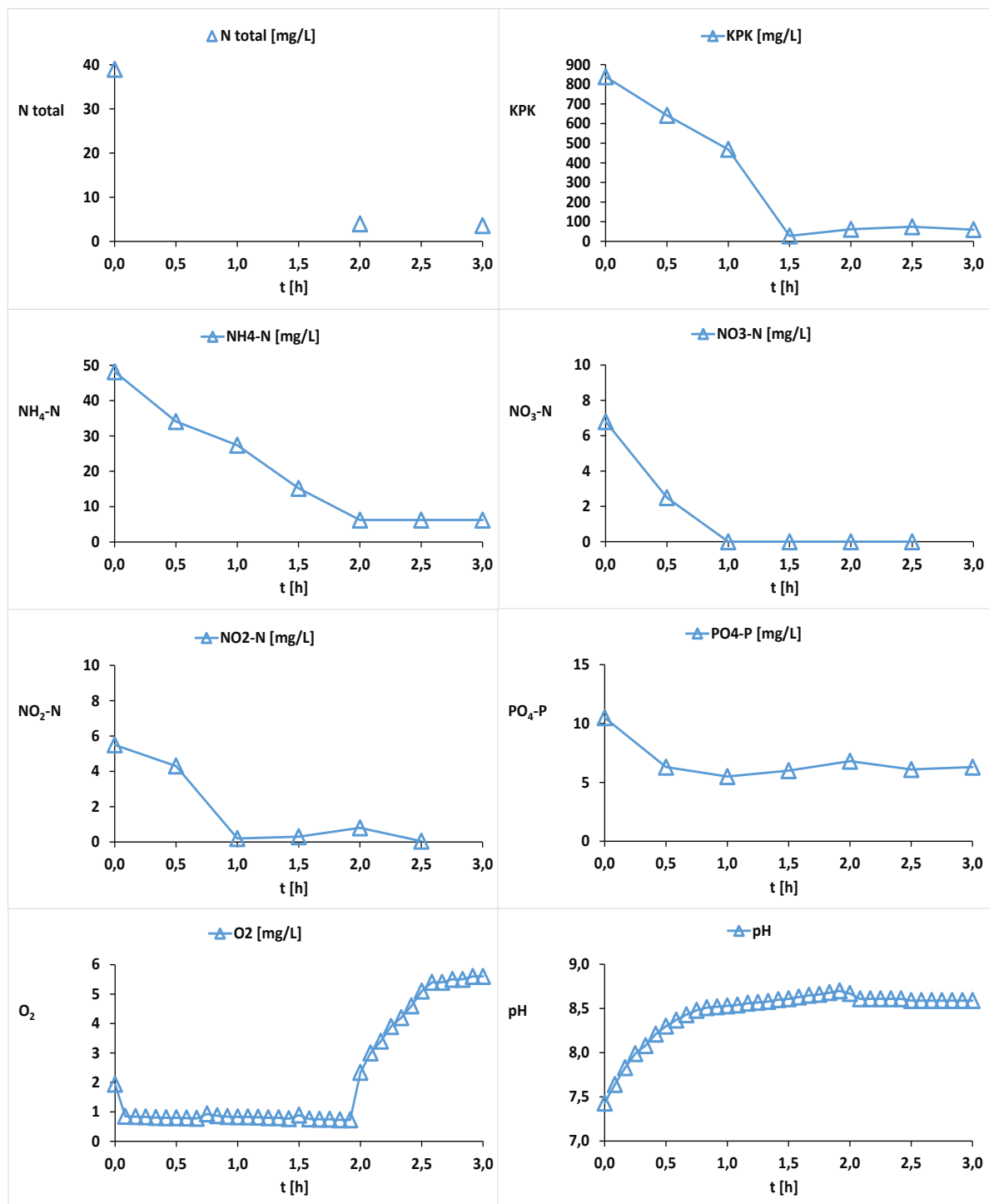
Istovremeno uz oksidaciju KPK zbivala se oksidacija NH_4^+-N ujednačenom brzinom od 19,2 mg $NH_4^+-N (Lh)^{-1}$ tijekom 2,5 sati pokusa. Velika raspoloživa količina KPK od početnih 800 mg KPK/L osigurava uklanjanje N, tako da se tijekom nitrifikacije ne bilježi nakupljanje NO_2^--N i NO_3^--N . Pokus je započeo sa 3,7 mg $NO_3^--N L^{-1}$ i 5,2 mg $NO_2^--N L^{-1}$ koji su se potpuno denitrificirani već u 0,5. satu pokusa, a maksimalna koncentracija NO_2^--N je zabilježena u 2. satu i iznosila je 0,9 mg $NO_2^--N L^{-1}$.

Po završetku nitrifikacije, u 2,5. satu pokusa, određeno je samo 5,3 mg $NO_3^--N L^{-1}$, što znači da je od početnih 47,9 mg $NH_4^+-N L^{-1}$ na kraju nitrifikacije nakupljeno svega 5,3 mg $NO_3^--N L^{-1}$ (Slike 11 i 13).

Uklanjanje P je zabilježeno tijekom prvog sata pokusa, intezvno tijekom prvih 0,5 sati brzinom 5,3 mg $PO_4^{3-}-P (Lh)^{-1}$, kada je uklonjeno 49,5 % $PO_4^{3-}-P$. Do kraja pokusa u 2,5. satu zabilježeno je otpuštanje $PO_4^{3-}-P$, te je u konačnici ostvareno 37,4% uklanjanje P, brzinom od 1,6 mg $PO_4^{3-}-P (Lh)^{-1}$ (Slike 11 i 13).

Promjene u profilu otopljenog kisika vidljive su nakon 2. sata pokusa, nakon završene oksidacije KPK i gotovo potpune oksidacije NH_4^+-N . Koncentracija kisika pri tome je znatno utrošena u te procese, a potom je zabilježen nagli porast otopljenog kisika (Slike 11 i 14).

Profil pH vrijednosti pokazuje porast pH od početka procesa, pH raste što je u skladu s potpunom denitrifikacijom, a nakon utroška KPK i oksidacije NH_4^+-N pH vrijednost pokazuje lagani pad vrijednosti što se može pripisati nakupljanju NO_3^--N doduše u maloj koncentraciji (Slike 11 i 14).



Slika 12. Aerobno uklanjanje N i P pri omjeru C/N 7

I pri odabranom omjeru C/N 7 što odgovara početnom KPK od 838,5mg KPK L⁻¹, aerobni pokus uklanjanja N i P se zbiva tijekom 3 sata, od početnih 48,2 mg NH₄⁺-N L⁻¹, 6,8 mg NO₃⁻-N L⁻¹ i 5,5 mg NO₂⁻-N L⁻¹ i 10,5 mg PO₄³⁻-P L⁻¹. U pokusu je ostvareno 89,7% uklanjanje N, 35,2% uklanjanje P i 92,6% uklanjanje KPK (Slike 12 i 13). Pokus je motren tijekom 3 sata.

KPK je uklonjen tijekom prvih 1,5 sati pokusa brzinom $540,6 \text{ mg KPK (Lh)}^{-1}$ (Slike 12 i 13). Brzine nitrifikacije i oksidacije $\text{NH}_4^+\text{-N}$ su bile iste, iznosile su $24,1 \text{ mg NH}_4\text{-N (Lh)}^{-1}$. Po završetku oksidacije $\text{NH}_4^+\text{-N}$ nije detektiran $\text{NO}_3^-\text{-N}$, a koncentracija $\text{NO}_2^-\text{-N}$ je iznosila $0,8 \text{ mg NO}_2^-\text{-N L}^{-1}$. Pokus je započeo sa $6,8 \text{ mg NO}_3^-\text{-N L}^{-1}$ i $5,5 \text{ mg NO}_2^-\text{-N L}^{-1}$, koji su potpuno denitrificirani u 1. satu pokusa (Slike 12 i 13).

Uklanjanje P se odvijalo tijekom 1. sata pokusa brzinom $5 \text{ mg PO}_4^{3-}\text{-P (Lh)}^{-1}$, čime je ostvareno 47,6% uklanjanje P, međutim, od 1. sata pokusa do kraja pokusa u 2. satu zabilježeno je blago otpuštanje P, te je na kraju pokusa zabilježeno 35,2% uklanjanje P, sveukupnom brzinom od $1,9 \text{ mg PO}_4^{3-}\text{-P (Lh)}^{-1}$ (Slike 12 i 13).

Tijekom oksidacije KPK i $\text{NH}_4^+\text{-N}$ znatan je utrošak otopljenog kisika, a nakon završene oksidacije $\text{NH}_4^+\text{-N}$ koncentracija otopljenog kisika se znatno povećala (Slike 12 i 14).

Profil pH vrijednosti pokazuje stalni trend rasta zbog redukcije $\text{NO}_3^-\text{-N}$ i $\text{NO}_2^-\text{-N}$, a potom se vrijednost pH održavala ustaljenom (Slike 12 i 14).

Istraživanje aerobnog uklanjanja N i P uz dodani izvor ugljika za odabrane omjere C/N 1, 3, 4, 5, 6 i 7 ukazuje da je s povećanjem omjera C/N proporcionalno veće uklanjanje N. Tako je pri omjerima C/N 1, 3, 4, 5, 6 i 7 zabilježeno uklanjanje N od 14,3%, 33,3%, 41,9%, 35,4%, 77,6% i 89,7% (Slika 13). Do sličnih rezultata došli su i Guo i sur. (2011) provedbom pokusa u SBR sustavima s početnim koncentracijama N 89 mg L^{-1} i P 15 mg L^{-1} . Zabilježili su da porastom omjera C/N od 1,5 do 6,9 učinkovitost uklanjanja N i P je poboljšana od 50 % do 96 %.

Uklanjanje N u aerobnim uvjetima se može pripisati aerobnoj denitrifikaciji. U pahuljicama aktivnog mulja se javlja gradijent koncentracije otopljenog kisika, pa u dubljim slojevima pahuljice ne vladaju aerobni uvjeti, kao na površini pahuljice, nego anoksični. U dubljim slojevima pahuljice zbog anoksičnih uvjeta se može odvijati denitrifikacija, te se na taj način odvija aerobna denitrifikacija.

Najveća brzina oksidacije $\text{NH}_4^+\text{-N}$ je zabilježena pri omjeru C/N 1 i iznosila je $31,9 \text{ mg NH}_4^+\text{-N (Lh)}^{-1}$, a brzine oksidacije $\text{NH}_4^+\text{-N}$ pri omjerima C/N 3, 4, 5, 6 i 7 su bile u uskom rasponu vrijednosti, iznosile su $19,2 \text{ mg NH}_4^+\text{-N (Lh)}^{-1}$ – $24,7 \text{ mg NH}_4^+\text{-N (Lh)}^{-1}$. Razlog smanjenju brzine oksidacije $\text{NH}_4^+\text{-N}$ je postupno povećanje organskog opterećenja (postupno povećanje C/N), i posljedično natjecanje za otopljeni kisik između nitrifikanata i heterotrofa.

Brzina nitrifikacije je s druge strane pri omjerima C/N 1, 3, 4 i 5 bila u rasponu $15,5 \text{ mg (Lh)}^{-1}$ – $16,4 \text{ mg (Lh)}^{-1}$ te je dalje rasla s povećanjem omjera C/N i iznosila $19,2 \text{ mg (Lh)}^{-1}$ i $24,1 \text{ mg (Lh)}^{-1}$ pri omjerima C/N 6 i C/N 7. S povećanjem organskog opterećenja bilo je više

raspoloživih elektron donora za denitrifikaciju nastalih NO_3^- -N i NO_2^- -N tijekom oksidacije NH_4^+ -N. Kako je raslo organsko opterećenje, tako su se brže denitrificirali nastali NO_3^- -N i NO_2^- -N, i pri omjerima C/N 6 i C/N 7, brzina nitrifikacije i brzina oksidacije NH_4^+ -N su bile identične. Huang i sur. (2015) su u eksperimentima s aerobnim granuliranim muljem pri početnoj koncentraciji 600 mg KPK L^{-1} i 200 mg NH_4^+ -N L^{-1} pokazali da mulj ima jako dobru nitrificirajuću sposobnost budući da se u efluentu nisu mogli detektirati NH_4^+ -N i NO_2^- -N.

Pri omjeru C/N 1 na kraju pokusa nakupljeno je najviše NO_3^- -N i to 34,7 mg NO_3^- -N L^{-1} , dok je pri omjerima C/N 3, 4 i 5 nakupljeno NO_3^- -N u rasponu 8,5 mg NO_3^- -N L^{-1} – 13,6 mg NO_3^- -N L^{-1} , a daljnjim povećanjem omjera C/N nakupljeno je značajno manje NO_3^- -N, pri C/N 6 omjeru svega 1,6 mg NO_3^- -N L^{-1} i pri C/N 7 omjeru 0 mg NO_3^- -N L^{-1} .

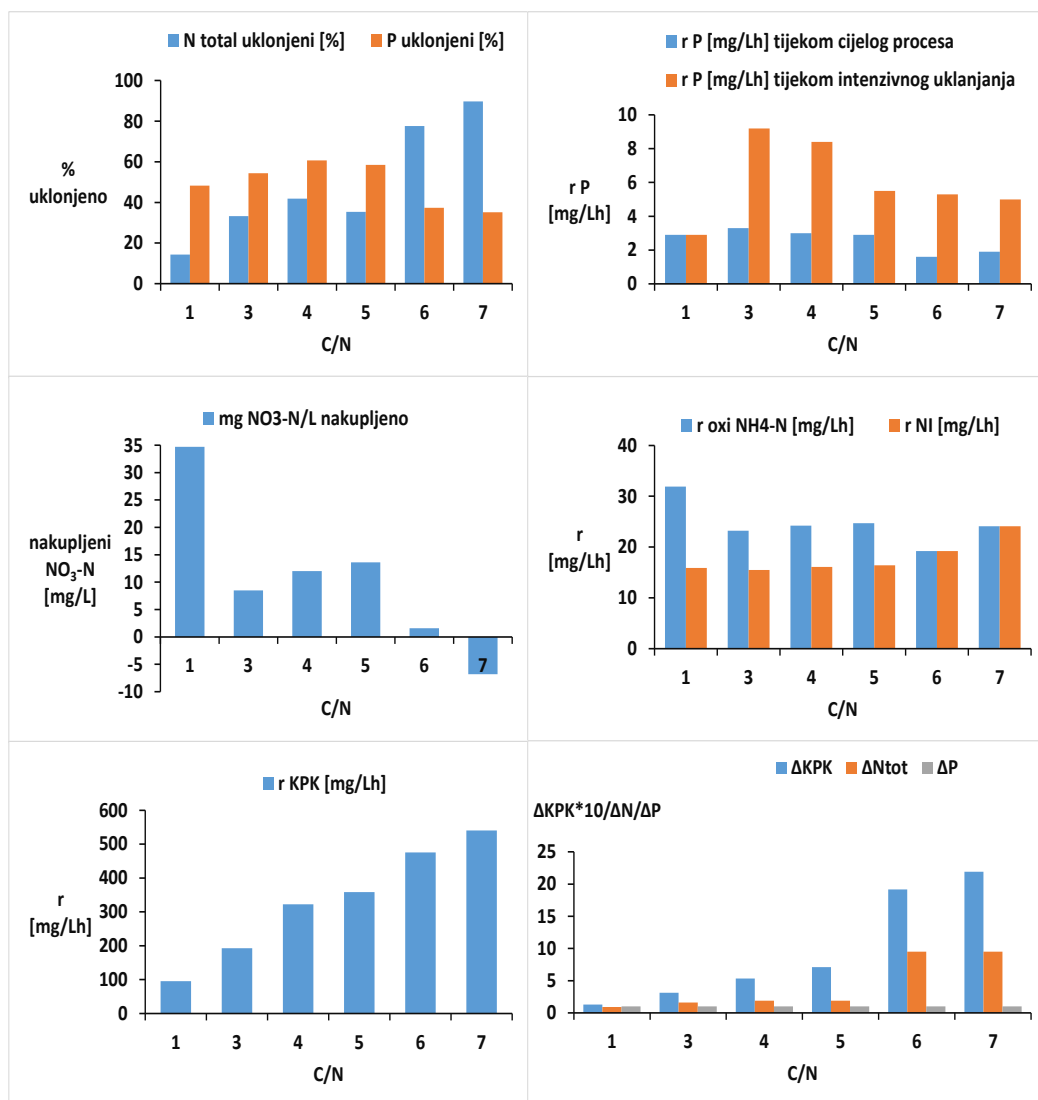
Povećanje organskog opterećenja je povoljno djelovalo na brzinu uklanjanja KPK, koja je pri omjerima C/N 1, 3, 4, 5, 6 i 7 iznosila 95,2 mg KPK (Lh) $^{-1}$, 192,3 mg KPK (Lh) $^{-1}$, 322,6 mg KPK (Lh) $^{-1}$, 358,3 mg KPK (Lh) $^{-1}$, 475,5 mg KPK (Lh) $^{-1}$ i 540,6 mg KPK (Lh) $^{-1}$. Također, ovi su rezultati u skladu s rezultatima koje su dobili Guo i sur. (2011) provedbom eksperimenata u SBR sustavima.

Uklanjanje P je raslo pri omjerima C/N 1, 3 i 4, i iznosilo je 48,3%, 54,4% i 60,7% i opadalo pri omjerima C/N 5, 6 i 7, čime je ostvareno 58,5%, 37,4% i 35,2% uklanjanje P. Ovi rezultati sugeriraju da je za aerobno uklanjanje P, kod istraženih omjera C/N 1, 3, 4, 5, 6 i 7, povoljan omjer C/N 4, pri čemu se postiže maksimalno 60,7% uklanjanje P. Daljnjim povećanjem omjera C/N uklanjanje P opada. Pri C/N omjerima manjim od povoljnog – optimalnog za istražene početne koncentracije N i P, pri omjeru C/N 1 i 3, mogući razlog manjeg uklanjanja P je nedovoljna količina KPK za potrebe PAO_s . Pri omjeru C/N > 4 u aerobnim uvjetima se odvijala kompeticija između aerobnih PAO_s i aerobnih denitrifikanata za KPK kojeg denitrifikanti troše za redukciju NO_x -N, a PAO_s za pohranu KPK kao unutarstanične rezerve ugljika, PHA, u uvjetima obilja a koji su vladali pri većem organskom opterećenju. Wang i sur. (2009) pokusima s dva SBR reaktora od kojih je prvi bio nadoklanjivan glukozom koncentracije 479 mg KPK L^{-1} , a drugi acetatom koncentracije 481 mg KPK L^{-1} uz početnu koncentraciju fosfora 35 mg L^{-1} pokazali su da se fosfor slabije uklanjao iz sustava kada je izvor ugljika acetat (23,3 – 28,5 %), što sugerira o povoljnijem izvoru ugljika za tu mikrobnu biomasu.

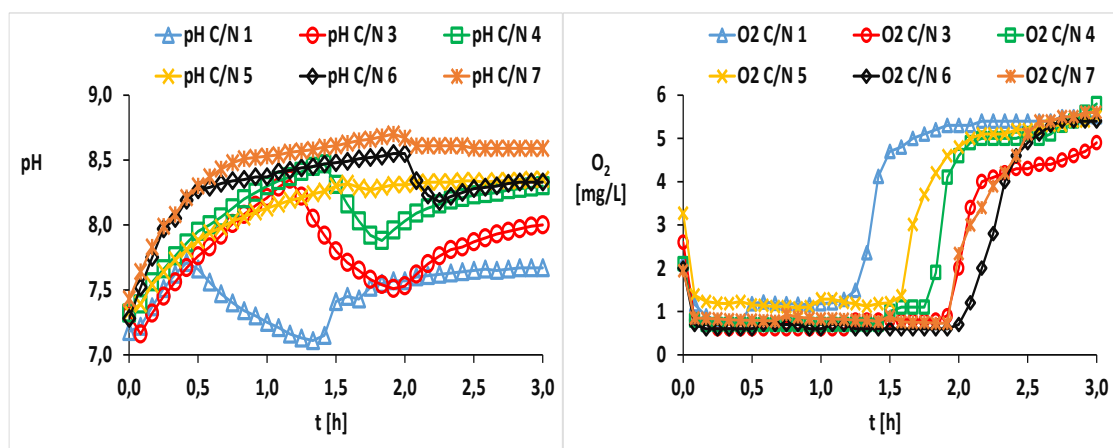
Istražujući s granuliranim aerobnim muljem pri 20 % zasićenju kisikom, de Kreuk i sur. (2005) dobili su još bolje rezultate, maksimalno simultano uklanjanje KPK (100%), 94% uklanjanje fosfora, 100% uklanjanje NH_4^+ -N nitrifikacijom i 94% uklanjanje ukupnog dušika.

U ovim pokusima pri svim odabranim i istraženim omjerima C/N, u profilu pH su vidljive karakteristične promjene u krivuljama kao odraz mikrobnih reakcija, a to su početni porast pH vrijednosti koji je karakterističan za trošenje KPK (Slike 7-12, 14). KPK se trošio u aerobnoj denitrifikaciji za redukciju nitrata prilikom koje se oslobađaju OH^- ioni koji uzrokuju porast pH vrijednosti. Kada je KPK bio utrošen, pH vrijednost je padala sve do završetka oksidacije $\text{NH}_4^+\text{-N}$, a zatim je vrijednost pH opet rasla. Tijekom oksidacije amonijaka nastaje $\text{NO}_2^-\text{-N}$ koji daljnjom oksidacijom daje $\text{NO}_3^-\text{-N}$ te zajedno snižavaju pH. Najniža točka u profilu pH je poznata kao „amonijeva dolina“ i označava završetak oksidacije $\text{NH}_4^+\text{-N}$ i najveću koncentraciju $\text{NO}_2^-\text{-N}$.

U profilu otopljenog kisika se također lako mogu razaznati dominantni procesi pri svim omjerima C/N (Slike 7-12, 14). U krivulji otopljenog kisika, prvi dio profila otopljenog kisika je plato koji označava nisku koncentraciju otopljenog kisika, a odgovara trošenju KPK. KPK se troši za odvijanje aerobne denitrifikacije, a do sličnih spoznaja došli su Yuan i Gao (2010) radeći s aerobnim granuliranim muljem. Nakon utroška KPK vidljiv je drugi plato nešto više koncentracije otopljenog kisika a koji označava oksidaciju $\text{NH}_4^+\text{-N}$. Odmah po utrošku $\text{NH}_4^+\text{-N}$ vidljiv je nagli skok u krivulji otopljenog kisika u profilu otopljenog kisika. Kisik nije više potreban u biološkom procesu jer su se sintetizirali $\text{NO}_2^-\text{-N}$ i $\text{NO}_3^-\text{-N}$ koji služe kao akceptori elektrona prilikom odvijanja denitrifikacije.



Slika 13. Aerobno uklanjanje N i P, usporedba procesa pri C/N 1, 3, 4, 5, 6 i 7



Slika 14. Profili pH i otopljenog kisika u aerobnom uklanjanju N i P pri C/N 1, 3, 4, 5, 6 i 7

5. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobivenih rezultata i uspoređujući ih sa istraživanjima prikazanim u literaturi mogu se donijeti sljedeći zaključci:

1. Aktivni mulj ima aktivnost za istovremenu nitrifikaciju, denitrifikaciju i biološko uklanjanje fosfata.
2. U aerobnim uvjetima, za istražene početne koncentracije $132,9-838,5 \text{ mg KPK L}^{-1}$, $48 \pm 1,3 \text{ mg NH}_4^+-\text{N L}^{-1}$, $\leq 15,3 \text{ mg NO}_3^--\text{N L}^{-1}$, $\leq 5,5 \text{ mg NO}_2^--\text{N L}^{-1}$ i $10,7-18,2 \text{ mg PO}_4^{3-}\text{P L}^{-1}$, s povećanjem omjera C/N postiže se veće uklanjanje dušika, od 14,3% pri omjeru C/N 1 do 89,7% pri omjeru C/N 7.
3. Maksimalno uklanjanje fosfata od 60,7% uklanjenog $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ postiže se pri omjeru C/N 4, uz natrijev acetat kao izvor ugljika.
4. Profili pH i otopljenog kisika neizravni su pokazatelji mikrobnih reakcija tijekom uklanjanja N i P.

6. LITERATURA

Bal Krishna, K. C., Aryal, A., Jansen, T. Challenges in the Microbiology of Enhanced Biological Phosphorus Removal. *Water Environ. Res.* **83**, 195-219.

Barat, R., Montoya, T., Borrás. L., Ferrer, J., Seco, A. (2008) Interactions between calcium precipitation and the polyphosphate-accumulating bacteria metabolism. *Water Res.* **42**, 3415-3424.

Bassin, J.P., Winkler, M.K.H., Kleerebezem, R., Dezotti, M., van Loosdrecht, M.C.M. (2012) Improved phosphate removal by selective sludge discharge in aerobic granular sludge reactors. *Biotechnol Bioeng* **109**, 1919-1928.

Bock, E., Stüven, R., Schmidt I., Zart, D. (1995) Nitrogen loss caused by denitrifying Nitrosomonas cells using ammonium or hydroxylamine as electron donors and nitrite as electron acceptor. *Arch. Microbiol.* **163**, 16-20.

Bond P.L., Hugenholtz P., Keller J., Blackall L.L. (1995). Bacterial community structures of phosphate-removing and non-phosphate removing activated sludges from sequencing batch reactors, *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1910-1916.

Booker, N.A., Priestley, A.J., Fraser, I.H. (1999) Struvite formation in wastewater treatment plants opportunities for nutrient recovery. *Environ Technol* **20** (7), 777-782.

Britton, A., Koch, F.A., Mavinic, D.S., Adnan, A., Oldham, W.K., Udala, B. (2005) Pilot-scale struvite recovery from anaerobic digester supernatant at an enhanced biological phosphorus removal wastewater treatment plant. *J Environ Eng Sci* **4** (4), 265-277.

Chua, A. S. M., Onuki, M., Satoh, H., Mino, T. (2006) Examining Substrate Uptake Patterns of Rhodocyclus-Related PAO in Full-Scale EBPR Plants by Using the MAR-FISH Technique. *Water Sci. Technol.* **54** (1), 63–70.

Coma, M., Verawaty, M., Pijuan, M., Yuan, Z., Bond, P. L. (2012) Enhancing aerobic granulation for biological nutrient removal from domestic wastewater. *Bioresour Technol* **103**, 101-108.

Crocetti, G.R., Banfield, J.F., Keller, J., Bond, P.L., Blackall, L.L. (2002) Glycogen-accumulating organisms in laboratory-scale and full-scale wastewater treatment processes. *Microbiology* **148**, 3353-3364.

de Kreuk, M. K., Heijnen, J. J., van Loosdrecht, M. C. M. (2005) Simultaneous COD, Nitrogen and Phosphate Removal by Aerobic Granular Sludge. *Biotechnol. Bioeng.* **90**, 761-769.

Gebremariam, Y. S., Beutel, M. W., Christian, D., Hess, T. F. (2011) Research Advances and Challenges in the Microbiology of Enhanced Biological Phosphorus Removal-A Critical Review. *Water Environ. Res.* **83**, 195-219.

Gebremariam, S.Y., Beutel, M.W., Christian, D., Hess, T.F. (2012) Effects of glucose on the performance of enhanced biological phosphorus removal activated sludge enriched with acetate. *Bioresour Technol* **121**, 19-24.

Gu, A.Z., Saunders, A.M., Neethling, J.B., Stensel, H.D., Blackall, L. (2005) In: WEF (Ed.) Investigation of PAOs and GAOs and their effects on EBPR performance at full-scale wastewater treatment plants in US, October 29-November 2, WEFTEC, Washington, DC, USA.

Guerrero, J., Guisasola, A., Baeza, J.A. (2011) The nature of the carbon source rules the competition between PAO and denitrifiers in systems for simultaneous biological nitrogen and phosphorus removal. *Water Res* **45**, 4793-4802.

Guerrero, J., Taya, C., Guisasola, A., Baeza, J.A. (2012) Understanding the detrimental effect of nitrate presence on EBPR systems: effect of the plant configuration. *J Chem Technol Biotechnol* **87**, 1508-1511.

Guo, H., Zhou, J., Zhang, S., Guo, Z. (2011) Characteristics of nitrogen and phosphorus removal in a sequencing batch reactor. *J. Environ. Sci.* **23**, 110–113.

Hao, X.D., van Loosdrecht, M.C.M. (2006) Model-based evaluation of struvite recovery from an in-line stripper in a BNR process (BCFS (R)). *Water Sci Technol* **53** (3), 191-198.

He, S., Bishop, F.I., McMahon, K.D. (2010) Bacterial community and *Candidatus Accumulibacter* population dynamics in laboratory-scale enhanced biological phosphorus removal reactors. *Appl Environ Microbiol* **76**, 5479-5487.

He, S., Gu, A. Z., McMahon, K. D. (2008) Progress Toward Understanding the Distribution of *Accumulibacter* Among Full-Scale Enhanced Biological Phosphorus Removal Systems. *Microbial Ecol.* **55** (2), 229–236.

Henze, M., Harremoes, P., la Cour Jansen, J., Arvin, E. (1997) Wastewater Treatment: Biological and Chemical Processes, 2. izd., Springer, Berlin, Germany.

Henze, M., Van Loosdrecht, M.C.M., Ekama, G., Brdjanovic, D. (2008) Biological wastewater treatment: Principles, Modelling and Design. IWA Publishing, London, UK.

Hesselmann R.P., Werlen C., Hahn D., van der Meer J.R., Zehnder A.J. (1999). Enrichment, phylogenetic analysis and detection of a bacterium that performs enhanced biological phosphate removal in activated sludge, *System Appl. Microbiol.* **22**, 454-465.

Hrenović, J. (2011) Bakterije odgovorne za biološko uklanjanje fosfata iz otpadnih voda. *Hrvatske vode*, **77**, 195-200.

Hu, Z., Zhang, J., Xie, H.J., Li, S.P., Wang, J.H., Zhang, T.T. (2011) Effect of anoxic/aerobic phase fraction on N₂O emission in a sequencing batch reactor under low temperature. *Bioresour Technol* **102**, 5486-5491.

Huang, W., Cai, W., Huang, H., Lei, Z., Zhang, Z., Tay, J. H., Lee, D. J. (2015) Identification of inorganic and organic species of phosphorus and its bio-availability in nitrifying aerobic granular sludge. *Water Res* **68**, 423-431.

Jena, J., Kumar, R., Saifuddin, M., Dixit, A., Das, T. (2016) Anoxic–aerobic SBR system for nitrate, phosphate and COD removal from high-strength wastewater and diversity study of microbial communities. *Biochem. Eng. J.* **105**, 80-89.

Kong, Y. H., Nielsen, J. L., Nielsen, P. H. (2004) Microautoradiographic Study of Rhodocyclus-Related Polyphosphate Accumulating Bacteria in Full-Scale Enhanced Biological Phosphorus Removal Plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 5383–5390.

Kuba, T., Wachtmeister, A., Vanloosdrecht, M.C.M., Heijen, J.J. (1994) Effect of nitrate on phosphorus release in biological phosphorus removal systems. *Water Sci Technol* **30** (6), 263-269.

Liu, X., Dong, C. (2011) Simultaneous COD and nitrogen removal in a micro-aerobic granular sludge reactor for domestic wastewater treatment. *Systems Engineering Procedia* **1**, 99-105.

Liu, Y., Tay, J.H., (2004) State of the art of biogranulation technology for wastewater treatment. *Biotechnol. Adv.* **22** (7), 533–563.

Liu, Y., Chen, Y., Zhou, Q. (2007) Effect of initial pH control on enhanced biological phosphorus removal from wastewater containing acetic and propionic acids. *Chemosphere* **66**, 123-129.

Lopez-Vazquez, C. M., Hooijmans, C. M., Brdjanovic, D., Gijzen, H. J., van Loosdrecht, M. C. M. (2008) Factors Affecting the Microbial Populations at Full-Scale Enhanced Biological Phosphorus Removal (EBPR) Wastewater Treatment Plants in the Netherlands. *Water Res.* **42**, 2349–2360.

Merzouki, M., Delgenes, J.P., Bernet, N., Moletta, R., Benlemlih, M. (1999). Polyphosphate accumulating and denitrifying bacteria isolated from anaerobic-anoxic and anaerobic-aerobic sequencing batch reactors, *Curr. Microbiol.* **38**, 9-17.

Metcalf & Eddy (2003) Wastewater Engineering: Treatment and Reuse, Fourth Edition, McGraw Hill Inc., New York, NY.

Mulder, A., Van De Graaf, A.A., Robertson, L.A., Kuenen, J.G. (1995) Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor *FEMS Microb. Ecology*, **16** (3), 177-184

Naessens, W., Maere, T., Nopens, I. (2012) Critical review of membrane bioreactor models- Part 1: biokinetic and filtration models. *Bioresour. Technol* **122**, 95-106.

Oehmen, A., Lemos, P. C., Carvalho, G., Yuan, Z., Keller, J., Blackall, L. L., Reis, M. A.M. (2007) Advances in enhanced biological phosphorus removal: From micro to macro scale. *Water Res.* **41**, 2271-2300.

Oehmen, A., Yuan, Z., Blackall, L.L., Keller, J. (2005) Comparison of Acetate and Propionate Uptake by Polyphosphate Accumulating Organisms and Glycogen Accumulating Organisms. *Biotechnol. Bioeng.* **91**, 162-168.

Pijuan, M., Ye, L., Yuan, Z. (2010) Free nitrous acid inhibition on the aerobic metabolism of poly-phosphate accumulating organisms. *Water Res* **44**, 6063-6072.

Popel, H.J., Jardin, N. (1993) Influence of enhanced biological phosphorus removal on sludge treatment. *Water Sci Technol* **28** (1), 263-271.

Rashed, E.M., El-Shafei, M. M., Heikal, M. A., Nouredin, A. M. (2014) Application of contact stabilization activated sludge for enhancing biological phosphorus removal (EBPR) in domestic wastewater. *HBRC Journal* **10**, 92-99.

Schmidt, I., Hermelink, C., de Pas-Schoonen, K., Strous, M., den Camp, H.J.O., Kuenen, J.G., Jetten, M.S.M. (2002) Anaerobic ammonia oxidation in the presence of nitrogen oxides (NO_x) by two different lithotrophs. *Appl. Env. Micr.* **68** (11), 5351-5357.

Schuler, A.J., Jenkins, D. (2002) Effects of pH on enhanced biological phosphorus removal metabolisms. *Water Sci Technol*, **46** (4-5), 171-178.

Seviour, R. J., Mino, T., Onuki, M. (2003) The microbiology of biological phosphorus removal in activated sludge systems. *Fems. Microbiology*. **27**, 99-127.

Sheng, G.P., Yu, H.Q. (2006) Characterization of extracellular polymeric substances of aerobic and anaerobic sludge using 3-dimensional excitation and emission matrix fluorescence spectroscopy. *Water Res* **40**, 1233-1239.

Stephens, H.M., Neethling, J.B., Benisch, M., Gu, A.Z., Stensel, H.D. (2004) Comprehensive analysis of full-scale enhanced biological phosphorus removal facilities. Water Environment Federation 77th Annual Conference and Exhibition, New Orleans, LA, USA.

Thomas, M., Wright, P., Blackall, L., Urbain, V., Keller, J. (2003) Optimisation of Noosa BNR plant to improve performance and reduce operating costs. *Water Sci Technol* **47** (12), 141-148.

Wang, D., Li, X., Yang, Q., Zeng, G., Liao, D., Zhang, J. (2008) Biological phosphorus removal in sequencing batch reactor with single-stage oxic process. *Bioresource Technol.* **99**, 5466–5473.

Wang, D., Li, X., Yang, Q., Zheng, W., Liu, Y., Cao, J., Yue, X., Shen, T., Zeng, G., Deng, J. (2009) The probable metabolic relation between phosphate uptake and energy storages formations under single-stage oxic condition. *Bioresource Technol.* **100**, 4005-4011.

Wang, Y.Y., Geng, J.J., Peng, Y.Z., Wang, C., Guo, G., Liu, S.H. (2012) A comparison of endogenous process during anaerobic starvation in anaerobic end sludge and aerobic end sludge from an anaerobic/anoxic/oxic sequencing batch reactor performing denitrifying phosphorus removal. *Bioresour Technol* **104**, 19-27.

Wentzel M.C., Comeau Y., Ekama G.A., van Loosdrecht M.C.M., Brdjanovic D. (2008). Enhanced biological phosphorus removal, u M. C. Wentzel; Biological wastewater treatment: Principles Modelling and Design. Edited by M. Henze, M.C.M. van Loosdrecht, G.A. Ekama and D. Brdjanovic. ISBN: 9781843391883. Published by IWA Publishing, London, UK.

Wong, M.T., Mino, T., Seviour, R.J., Onuki, M., Liu, W.T., (2005) In situ identification and characterization of the microbial community structure of full-scale enhanced biological phosphorus removal plants in Japan. *Water. Res.* **39** (13), 2901-2914.

Xu, X.Y., Liu, G., Zhu, L. (2011) Enhanced denitrifying phosphorous removal in a novel anaerobic/aerobic/anoxic (AOA) process with the diversion of internal carbon source. *Bioresour Technol* **102**, 10340-10345.

Yan, L., Zhang, S., Hao, G., Zhang, X., Ren, Y., Wen, Y., Guo, Y., Zhang, Y. (2016) Simultaneous nitrification and denitrification by EPSs in aerobic granular sludge enhanced nitrogen removal of ammonium-nitrogen-rich wastewater. *Bioresour Technol* **202**, 101–106.

Yuan, X., Gao, D. (2010) Effect of dissolved oxygen on nitrogen removal and process control in aerobic granular sludge reactor. *J. Hazard. Mater.* **178** (1–3), 1041–1045.

Zhang, T., Liu, Y., Fang, H. H. P. (2005) Effect of pH Change on the Performance and Microbial Community of Enhanced Biological Phosphate Removal Process. *Biotechnol. Bioeng.* **92** (2), 173–182.

Zhou, Y., Ganda, L., Lim, M., Yuan, Z., Ng, W.J. (2012) Response of poly-phosphate accumulating organisms to free nitrous acid inhibition under anoxic and aerobic conditions. *Bioresour Technol* **116**, 340-347.

Zhou, Y., Pijuan, M., Zeng, R.J., Lu, H., Yuan, Z. (2008) Could polyphosphate-accumulating organisms (PAOs) be glycogen-accumulating organisms (GAOs). *Water Res* **42**, 2361-2368.

7. PRILOG

Popis korištenih kratica

Kratica	Značenje
DPAO	denitrificirajući fosfat akumulirajući organizmi (<i>eng. Denitrifying Phosphate Accumulating Organisms</i>)
EBPR	pojačano biološko uklanjanje fosfora (<i>eng. Enhanced Biological Phosphorus Removal</i>)
FISH	fluorescentna in situ hibridizacija
GAO	glikogen akumulirajući organizmi (<i>eng. Glycogen Accumulating Organisms</i>)
KPK	kemijska potrošnja kisika ($\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$)
PAO	fosfat akumulirajući organizmi (<i>eng. Phosphate Accumulating Organisms</i>)
PHA	poli- β -hidroksialkanoati
poli-P	polifosfati
VFA	hlapljive masne kiseline (<i>eng. Volatile Fatty Acids</i>)
PHB	polihidroksibutirati
DO	koncentracija otopljenog kisika (dissolved oxygen)
MLSS	koncentracija aktivnog mulja (<i>eng. Mixed Liquor Suspended Solids</i>)
FNA	slobodna dušikasta kiselina
SRT	Vrijeme zadržavanja mulja (<i>eng. Sludge Retention Time</i>)
BCFS	Proces biološko-kemijskog uklanjanja fosfora i dušika (<i>eng. Biological-Chemical Phosphorus And Nitrogen Removal Process</i>)
SBR	Sekvencionirani šaržni reaktor (<i>eng. Sequencing Batch Reactor</i>)